

MARIA CAROLINA FERREIRA

***PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS (CD4⁺CD25⁺) NA
IMUNOSSUPRESSÃO OBSERVADA EM PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, Área de Concentração em Ciências
Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413p Ferreira, Maria Carolina
Participação de células T reguladoras (CD4+CD25+) na
imunossupressão observada em pacientes com paracoccidioidomicose /
Maria Carolina Ferreira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Ronei Luciano Mamoni, Maria Heloisa Souza Lima
Blotta

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células t reguladoras. 2. Supressão. 3. Citocinas. 4.
Paracoccidioidomicose. I. Mamoni, Ronei Luciano. II. Blotta,
Maria Heloisa Souza Lima. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Participation of regulatory T cells (CD4+ CD25+) in the
immunossupression observed on paracoccidioidomycosis**

Keywords: • Regulatory T cells
• Supression
• Cytokines
• Paracoccidioidomycosis

Titulação: Mestre em Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni
Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro

Data da defesa: 02-03-2009

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Maria Carolina Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

Membros:

1. Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni -

2. Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara -

3. Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/03/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sandra e Edson que sempre me amaram, compreenderam e acreditaram em mim e ao meu avô Leonildo, dedico esse trabalho.

Ao meu orientador Ronei pela paciência (quase) infinita.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Raphael pelas tantas caronas, por toda a diversão e pelos finais de semana em que ele e os meus pais “passearam” pela Unicamp enquanto eu fazia meus experimentos.

A Deus e a vida que me deram tanto!!!

Agradeço ao meu orientador Dr. Ronei Luciano Mamoni por toda a ajuda, pelos conselhos e idéias, por compartilhar seus conhecimentos comigo e por estar sempre por perto quando eu preciso. A Dra. Heloísa Blotta por me ceder o laboratório e pela disposição em ajudar.

A Larissa, Rômulo e Fernanda pelas vezes em que gastaram parte do seu tempo comigo, esperando por pacientes no ambulatório.

Aos meus amigos do laboratório Rômulo, Camilinha, Fernanda, Ana Lúcia, Munir, Fábio, Roseane e Marcinha com os quais tive e tenho a sorte de poder conviver.

As minhas amigas queridas Jacy e Vânia por me ensinarem muitas coisas no laboratório e por não se importarem pelos corantes que fui distribuindo aqui e ali e a Patty, obrigada por tudo! A Liana Verinaud, minha primeira orientadora.

A Larissa por esses anos em que temos compartilhado risos, alegrias, trabalho, experiências e tudo o mais.

A Lilian por continuar fazendo parte da minha vida desde a graduação e aos meus novos e fiéis amigos Gleice e Adriano.

Aos pacientes que gentilmente (e bravamente) colaboraram doando sangue para o estudo e, sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

Aos professores da Banca Examinadora Ângela M. S. C. Soares, Niels Olsen Saraiva Câmara e Wirla Maria S. C. Tamashiro pela leitura da tese e pelas pertinentes sugestões.

Ao Prof. Anibal Vercesi por ceder o citômetro de fluxo e aos seus alunos pela ajuda durante as leituras.

A FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro para o projeto de pesquisa.

Pensamento e teoria devem preceder todas as ações saudáveis;
ainda que a ação seja mais nobre que o pensamento ou a teoria.

Virginia Woolf

LISTA DE ABREVIATURAS

CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
ConA	Concanavalina A
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CTLA-4	Cellular T cell associated antigen 4
DA	Doença ativa
DT	Doença tratada
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FA	Forma Adulta
FJ	Forma Juvenil
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif
LAP	latency associated peptide
PCM	paracoccidioidomicose
PHA	Fitohemaglutinina
Q-RT-PCR	Quantitative Real Time Polimerase reaction chain
TGF	Tumor growth factor
Th3	Células T “helper” 3
THT	Teste de hipersensibilidade tardia
Tr1	Células reguladoras produtoras de IL-10

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Estratégia de análise da expressão de marcadores em células CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁻	42
Figura 3.2 - “Dot-plots” da análise por citometria de fluxo da composição das CMSP	44
Figura 3.3 - Estratégia de análise do fenótipo de células T com atividade supressora em circulação.....	46
Figura 4.1 - Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ no sangue periférico.....	53
Figura 4.2 - Análise <i>ex vivo</i> do número de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	54
Figura 4.3 - Análise da expressão do RNAm para FoxP3.....	55
Figura 4.4 - Análise do fenótipo de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ ou CD4 ⁺ CD25 ⁻	57
Figura 4.5 - Análise da resposta proliferativa das células TCD4 ⁺ ou TCD4 ⁻	59
Figura 4.6 - Análise da proliferação de células T CD4 ⁺ CD25 ⁻ na presença de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ autólogas.....	61
Figura 4.7 - Análise da inibição de proliferação por células CD4 ⁺ CD25 ⁺	63
Figura 4.8 - Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4 ⁺ de CMSP alogênicas e cocultivadas com diferentes quantidades de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	66
Figura 4.9 - Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4 ⁻ de CMSP alogênicas cocultivadas com diferentes quantidades de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	67
Figura 4.10 - Análise da proliferação de células T CD4 ⁺ de CMSP em sistema “transwell”	68
Figura 4.11 - Análise da resposta proliferativa de CMSP alogênicas em cultura convencional ou em transwell na presença de anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF.....	70

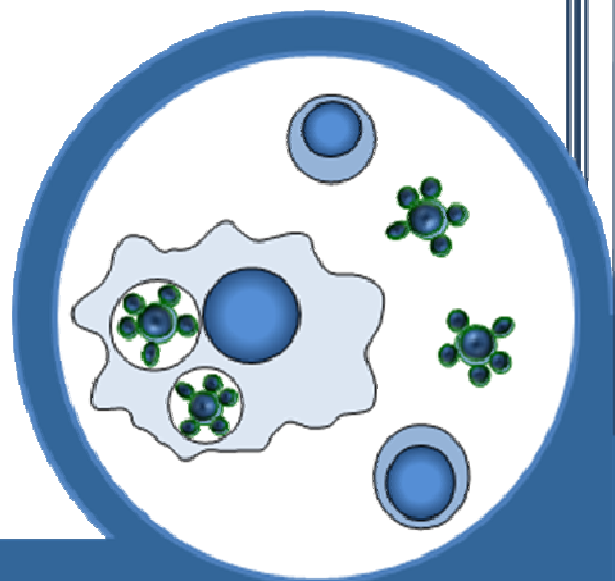
Figura 4.12 - Análise da proliferação CMSP cocultivada na presença de citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes.....	72
Figura 4.13 - Análise da expressão do RNAm mensageiro para IL-10 e TGF- β	74
Figura 4.14 - Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de CMSP ou células CD4 ⁺ CD25.....	76
Figura 4.15 - Avaliação da produção de TGF- β em sobrenadantes de cultura de CMSP ou células CD4 ⁺ CD25 ⁻	78
Figura 8.1 - Gráficos de amplificação e curva padrão resultados da padronização da eficiência das reações de Q-RT-PCR para quantificação do RNAm para UBC,FoxP3, IL-1 e TGF- β	108
Figura 8.2 - Correlação entre as eficiências do gene endógeno e os genes de interesse: FoxP3, IL-10 e TGF- β	109
Figura 8.3 - Curvas de “melting” representativas de resultados obtidos após a realização de testes de amplificação do RNAm.....	110

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS E ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	355
2.1 Objetivos	35
2.2 Abordagem Experimental.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS..	38
3.1 Casuística	38
3.2 Obtenção do antígeno celular de <i>P.brasiliensis</i> (cAg).....	39
3.3 Determinação da porcentagem e do fenótipo de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ no sangue periférico por citometria de fluxo	39
3.4 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	43
3.5 Separação magnética da população CD4 ⁺ CD25 ⁺	45
3.6 Marcação das células com CFSE	45
3.7 Avaliação da atividade supressoras das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ .(inibição da proliferação) em coculturas convencionais e em sistema “ <i>transwell</i> ”.	47
3.8 Avaliação da participação da produção e consumo de citocinas na inibição da proliferação mediada por células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	47
3.9 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de culturas.....	48
3.10 Avaliação da expressão gênica de FoxP3, IL-1480 e TGF- β	48
3.10.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA.....	49
3.10.2 Q-RT-PCR.....	50
3.11 Análise Estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Avaliação da porcentagem de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no sangue periférico.....	53

4.2	Análise da expressão do RNA mensageiro para FoxP3 em células mononucleares do sangue periférico (<i>ex vivo</i>) de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa e controles normais.....	55
4.3	Caracterização fenotípica das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁻ presentes no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e controles normais.	56
4.4	Avaliação da atividade supressora de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ de pacientes com paracoccidiodomicose e controles normais.	58
4.5.	Avaliação da necessidade de contato intercelular para a atividade supressora de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ de pacientes com paracoccidiodomicose (sistema “transwell”).	64
4.6.	Avaliação do papel da produção de citocinas (IL-10 e TGF-β) e do consumo de IL-2 na atividade supressora de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	69
4.7.	Avaliação da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-10 e TGF-β em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose ativa e controles normais.....	73
4.8.	Avaliação da produção de IL-10 e TGF-β em culturas de células.....	74
5.	DISCUSSÃO.....	80
6.	CONCLUSÃO	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8.	ANEXOS	108
8.1.	Padronização das reações de PCR em tempo real	108
8.2.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (cópia digitalizada)	111
8.3.	Termo de consentimento pós-informação	114

Resumo

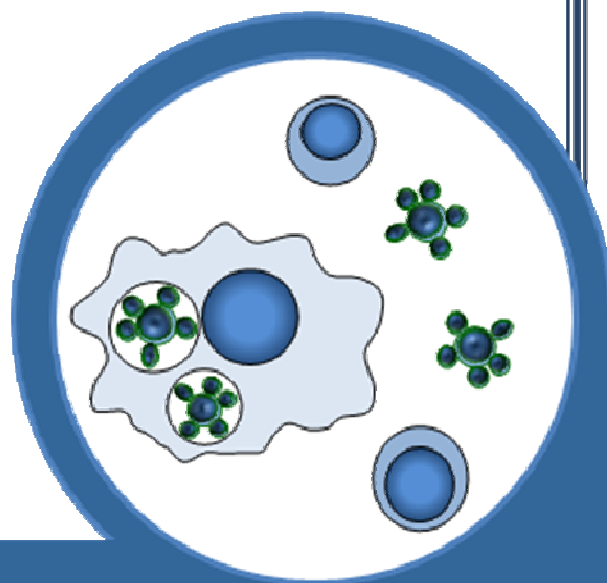


RESUMO

Pacientes com paracoccidioidomicose (PCM) apresentam supressão da resposta imunológica celular, caracterizada por testes de hipersensibilidade do tipo tardio negativos a antígenos do *P. brasiliensis*, alta taxa de apoptose de linfócitos e alta expressão de CTLA-4 (CD152) e alta produção de citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β). Esses dados indicam a possível participação de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺ - Tregs) na PCM. O objetivo desse trabalho foi verificar se, e por qual mecanismo as células T regulatórias estão envolvidas nessa imunossupressão. Para isso, analisamos o número, fenótipo, assim como a atividade funcional das células regulatórias do sangue periférico de pacientes com PCM antes e após o tratamento antifúngico efetivo. O número e o fenótipo das células T regulatórias foram avaliados por citometria de fluxo, e os resultados demonstraram que pacientes com PCM ativa (DA) apresentam um maior número dessas células que pacientes tratados (DT) ou controles normais (C). Além disso, observamos uma maior expressão de CD95L, CTLA-4, LAP-1 e GITR em células regulatórias do grupo DA em relação aos grupos DT e C. A expressão do RNAm (quantificado por PCR em tempo real) para FoxP3, IL-10 e TGF- β em CMSP *ex vivo* também foram maiores no grupo DA que nos controles e pacientes do grupo DT. Com o intuito de comparar a atividade funcional das células T regulatórias, analisamos o efeito da cocultura com células T regulatórias na resposta proliferativa de CMSP estimuladas com ConA. As células regulatórias do grupo DA exibiram uma atividade supressora maior que as provenientes do grupo DT ou C, de uma maneira dose dependente. Para verificar se o mecanismo por meio do

qual as células regulatórias exercem sua atividade é dependente de contato, utilizamos um sistema “transwell”. Os resultados demonstraram que a atividade supressora das células T regulatórias do grupo controle é dependente de contato, mas que essa atividade para as células provenientes dos pacientes do grupo DA é apenas parcialmente revertida com esse sistema. A adição de citocinas supressoras recombinantes (IL-10 e TGF- β), assim como de anticorpos neutralizantes para essas citocinas nas coculturas, mostrou que a produção de citocinas regulatórias pode ser outro mecanismo utilizado pelas células regulatórias do grupo DA. Em conclusão, o número aumentado de células T regulatórias no sangue periférico de pacientes com DA, expressando altos níveis de moléculas associadas à atividade regulatória, ao lado da alta expressão do RNAm para Foxp3, IL-10 e TGF- β , sugere uma participação dessa população de linfócitos na imunossupressão observada em pacientes com PCM ativa. Além disso, nossos resultados indicam que as células T regulatórias dependem principalmente do contato intercelular para exercer seus efeitos supressores, e que a produção de citocinas supressoras também está envolvida nesse processo.

Abstract

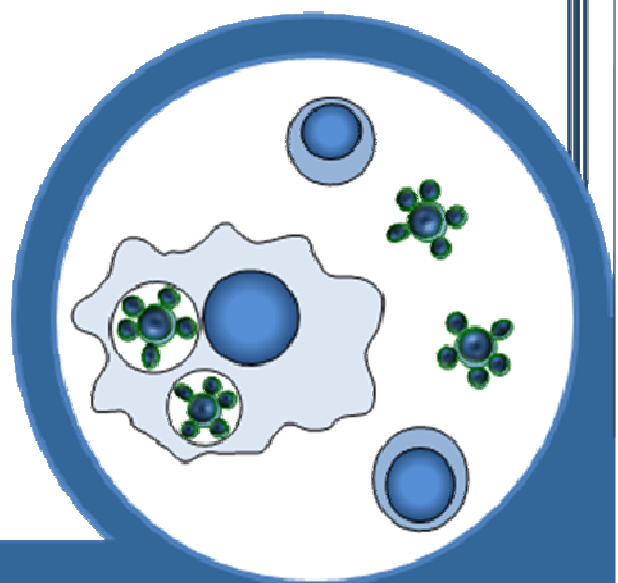


ABSTRACT

Patients with paracoccidioidomycosis (PCM) present suppression of cellular immune response characterized by negative DTH to *P. brasiliensis* antigens, elevated apoptosis of lymphocytes, high expression of CTLA-4, and production of IL-10 and TGF- β . Together these data point towards the involvement of regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺ - Tregs) in PCM. The aims of this study were to verify whether and how Tregs are involved in this immunosuppression, through the analysis of the number and the phenotype, as well as, the functional activity of Tregs cells from peripheral blood of patients before and after antifungal treatment. The number and phenotype of Tregs cells were evaluated by flow cytometry, and the results showed that PCM patients with active disease (AD) present higher number of Treg cells than patients after treatment (TD) or healthy controls (C). Furthermore, we observed higher expression of CD95L, CTLA-4, LAP-1 and GITR on Tregs from AD group, than in cells from TD and C groups. mRNA expression (quantified by qRT-PCR) for FoxP3, IL-10 and TGF- β in *ex vivo* PBMC, were also higher in AD group than in controls and in TD group. In order to compare the functional activity of Tregs, we analyzed the effect of Treg cells on the proliferative response of PBMC stimulated with ConA. Tregs from AD group exhibited stronger regulatory activity than cells from TD and C groups, in a dose dependent manner. To verify the possible mechanism through which Tregs suppress the cell proliferation we utilized a transwell system, which showed that the contact is mandatory for regulatory activity of Treg cells from C group, but had only a partial involvement in cells from AD patients. The addition of IL-10 and TGF- β and anti-

cytokines in the co-cultures showed that the production of immunoregulatory cytokines may be other mechanism used by Tregs. In conclusion, the increased number of Treg cells in peripheral blood of patients with active disease, expressing high levels of regulatory markers and suppressive activity, besides the high expression of Foxp3, IL-10 and TGF- β mRNAs suggest the potential participation of this population in the immunosuppression observed during the disease. Moreover, our results indicate that Tregs act mainly by contact to exert their inhibitory effects, but the production of immunoregulatory cytokines are also involved.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior incidência nos países da América Latina, sendo o Brasil o país que concentra o maior número de casos. A doença é causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* que na natureza ou em meio de cultura à temperatura de 25°C apresenta-se na forma miceliana e, quando à 37°C, em cultura ou no organismo do hospedeiro, se converte em células leveduriformes. A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos do fungo que se depositam nos pulmões causando lesões locais, ou que podem se disseminar via corrente sanguínea ou linfática para diversos órgãos como fígado, baço, glândulas suprenais, medula óssea, mucosas e pele (revisto por Brummer *et al*, 1993).

A infecção pelo *P. brasiliensis* pode ter três resultados: a PCM-infecção (PI), comum em indivíduos que residem ou trabalham em áreas endêmicas e que entram em contato com o fungo e que apresentam intensa resposta ao teste de hipersensibilidade tardia (THT) a antígenos fúngicos e não apresentam os sintomas da doença; a forma juvenil (FJ) encontrada em crianças e jovens de ambos os sexos e caracterizada pelo acometimento dos linfonodos, fígado, baço e disfunção na medula óssea, semelhante àquela encontrada em doenças linfoproliferativas; e a forma adulta (FA) ou crônica que acomete majoritariamente homens adultos entre 30 e 60 anos. A forma adulta apresenta manifestações clínicas que variam desde lesões pulmonares isoladas (forma unifocal) ao acometimento sistêmico (forma multifocal) (Franco *et al.*, 1987; Brummer *et al.*, 1993).

Cada uma das formas da PCM é caracterizada por diferentes padrões de resposta imunológica, fato que se reflete nos tipos de imunoglobulinas e de citocinas produzidas. Na forma adulta unifocal observa-se a produção aumentada de IgG1, ao passo que na formas mais graves e disseminadas ocorre maior produção de IgE e IgG4, assim como na forma juvenil que apresenta também elevada produção de IgA (Baida *et al.*, 1999; Mamoni *et al.*, 2001; Mamoni *et al.*, 2002). Durante o tratamento esse perfil se modifica com acentuada queda de IgG1 na forma adulta e de IgE na forma juvenil, enquanto os níveis de IgG4 se mantêm constantes durante todo o tratamento na forma juvenil (Mamoni *et al.*, 2001; Mamoni *et al.*, 2002). Esses dados correlacionam-se com aqueles obtidos a partir de estudos com modelos experimentais nos quais a resistência à doença pode ser associada com a produção de IgG2a e a suscetibilidade com altos níveis de IgG1 (Cano *et al.*, 1995).

Tem sido observado ainda que a forma juvenil e a PCM-infecção apresentam-se como pólos de resposta Th2 e Th1 respectivamente, e que a forma adulta revela um padrão intermediário. Esses padrões são caracterizados pela produção de altos níveis de IFN- γ e de TNF- α pelos indivíduos com PI ou com a forma adulta unifocal, também caracterizadas por reação positiva ao THT e baixos títulos séricos de anticorpos; enquanto a FA disseminada e FJ são caracterizadas por resposta predominantemente Th2 com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β 1, eosinofilia e produção diminuída de IFN- γ , além de altos títulos de anticorpos no soro e resposta a THT negativa (Mamoni *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Mamoni e Blotta, 2005; Mamoni e Blotta, 2006).

A depressão da resposta imunológica celular, evidenciada pela anergia ao THT e a proliferação de linfócitos diminuída frente a antígenos do fungo, têm sido apontada em estudos desde a década de 70 (Musatti *et al.*, 1976; Restrepo *et al.*, 1978; Mota *et al.*, 1985) e foi caracterizada pela supressão da resposta ao THT de caráter não específico, visto que há depressão da resposta para outros antígenos além de antígenos do *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.*, 1978). Paralelamente, achados semelhantes foram feitos em modelo experimental no qual os animais apresentaram resposta imune celular prejudicada aos antígenos do fungo (Singer-Vermes *et al.*, 1993), sendo que a transferência adotiva de células de linfonodo e baço de animais inoculados com *P. brasiliensis*, torna animais sadios pouco responsivos ao THT (Jimenez-Finkel e Murphy, 1988). Os mecanismos envolvidos nesta imunossupressão ainda não estão totalmente descritos, mas parecem relacionar-se com o desequilíbrio no perfil de citocinas produzidas. Dessa forma, em pacientes com PCM é observada uma produção diminuída de IL-2 e IFN- γ e grande produção de IL-10, sendo esta última uma citocina com atividade antiinflamatória e que, portanto, pode ser associada à baixa resposta proliferativa *in vitro* de células mononucleares (Benard *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1997; Benard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002).

Outra molécula provavelmente envolvida na imunossupressão é o CTLA-4 (CD152) visto que em cultura, células mononucleares de pacientes com PCM recuperam sua capacidade proliferativa quando são adicionados ao meio de cultura anticorpos que neutralizam o CTLA-4, sendo este bloqueio acompanhado pelo aumento da produção de IFN- γ (Campanelli *et al.*, 2003). Outra possível

causa da escassa resposta imune celular observada em indivíduos com PCM é a morte de linfócitos T ativados via a interação Fas-FasL (CD95-CD95L), fato verificado *in vitro* através do bloqueio dessa ligação que resulta em significativa redução da taxa de apoptose em células mononucleares obtidas desses pacientes (Cacere *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2003).

Em conjunto, o aumento das taxas de apoptose, da expressão de CTLA-4, a ausência de resposta de hipersensibilidade tardia e a baixa resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo observados em pacientes com PCM apontam para a regulação negativa da resposta imunológica do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento da doença.

A regulação da resposta imunológica a vários patógenos tem sido bem documentada e parece estar relacionada à ação de células T com atividade regulatória (Netea *et al.*, 2004; Ji, J. *et al.*, 2005; Campanelli *et al.*, 2006; Guyot-Revol *et al.*, 2006; Ji, M. J. *et al.*, 2006; Keynan *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2008). As células T regulatórias constituem um conjunto de populações celulares que possuem atividade supressora e que desempenham importante papel no controle da autoimunidade, da rejeição a transplantes, da reação inflamatória exacerbada a diversos patógenos e da manutenção da homeostase (Rezvani *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007; Parietti *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008; La Cava, 2008; La Cava, 2008; Piccirillo, 2008; Piccirillo *et al.*, 2008; Terme *et al.*, 2008; Waid *et al.*, 2008). Ao que parece, para cada situação e microambiente inflamatório uma ou mais populações de células regulatórias podem ser recrutadas ou diferenciadas, e na população de células CD4⁺ foram caracterizadas subpopulações de células regulatórias naturais e induzidas. Dentre as células que se tornam regulatórias na

periferia estão as células Tr1 que são produtoras de IL-10, as células T_H3 que são grandes produtoras de TGF- β e células T regulatórias induzidas (T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ induzidas) (Cottrez e Groux, 2004; Wohlfert e Belkaid, 2008). Já as células ditas regulatórias naturais, que se diferenciam no timo e expressam constitutivamente a cadeia alfa do receptor para a IL-2 (CD25), representam a população de células regulatórias melhor caracterizada e mais bem estudada (Bach, 2003; Bluestone e Abbas, 2003).

Além de expressar o marcador CD25, grande parte das células T regulatórias expressa também GITR, Fas (CD95), FasL (CD95L), CD103, CD38, CTLA-4 (CD152), LAP-1 (TGF- β de membrana) e CD62L, considerados marcadores adicionais dessas células (Vignali *et al.*, 2008).

O GITR apresenta grande importância funcional nas células regulatórias, essa molécula é expressa constitutivamente por essas células, e pode ser induzida durante a ativação dos linfócitos T CD4⁺ convencionais. Aparentemente o GITR apresenta um papel importante na expansão das populações de linfócitos durante a sua ativação por meio da interação com o seu ligante (GITRL) expresso em células apresentadoras de antígeno (Shevach e Stephens, 2006). O GITR apresenta uma cinética de expressão diferenciada em linfócitos convencionais e em células regulatórias, enquanto nos primeiros a expressão é transitória, nas células regulatórias a sua expressão é constante, podendo contribuir para o aumento e para a manutenção da subpopulação de células regulatórias, que dessa forma podem controlar a resposta imunológica após a eliminação do estímulo antigênico (Uraushihara *et al.*, 2003; Shevach e Stephens, 2006).

A molécula CTLA-4 também é expressa logo após a ativação em linfócitos T convencionais e apresenta-se constitutivamente expressa em células regulatórias naturais (Tang *et al.*, 2004; Greenwald *et al.*, 2005), sendo a sua expressão controlada pelo fator de transcrição Foxp3. O CTLA-4 liga-se com alta afinidade às moléculas de CD80 e CD86 em células apresentadoras de antígenos, e nos linfócitos convencionais apresenta um papel importante na regulação de sua ativação. Por se ligar às moléculas de CD80 e CD86 com alta afinidade, o CTLA-4 compete com a molécula de CD28 (molécula presente na sinapse imunológica e associada com a ativação dos linfócitos) (Greenwald *et al.*, 2005). O CTLA-4 apresenta em sua porção intracelular um domínio ITIM, sendo responsável pela ativação intracelular de diversas fosfatases que tem a função de controlar o processo de ativação celular (Greenwald *et al.*, 2005). O seu papel no controle da resposta imunológica foi demonstrado em diversos modelos: animais deficientes para essa proteína morrem prematuramente devido a uma inflamação generalizada e ainda, foi observada associação entre polimorfismos de CTLA-4 e doenças autoimunes como o diabetes tipo I (Wing *et al.*, 2008). Sua função em células T regulatórias foi evidenciada por Wing e colaboradores (2008) por meio da utilização de células FoxP3⁺ provenientes de animais deficientes em CTLA-4, a transferência dessas células para animais depletados de células T regulatórias é incapaz de reverter uma resposta inflamatória exacerbada, e os animais apresentam morte prematura e o desenvolvimento de esplenomegalia e linfadenopatia com hiperprodução de IgE e de miocardite aguda letal. Tais observações evidenciam que o CTLA-4 está fortemente ligado a capacidade das células regulatórias em conter a resposta inflamatória, na ausência deste, a

atividade dessas células fica comprometida impedindo-as de exercer sua atividade (Wing *et al.*, 2008).

Ao lado das moléculas expressas na superfície das células, o fator de transcrição FoxP3 expresso preferencialmente por esse tipo celular, tem sido descrito como marcador de atividade de células T regulatórias. A importância do Foxp3 na atividade de células T regulatórias foi evidenciada em trabalhos como o de Brunkow *et al.* (2001) que verificaram que camundongos mutantes para o gene que codifica para FoxP3 desenvolvem uma grave doença linfoproliferativa e morrem pouco tempo após o nascimento (Brunkow *et al.*, 2001). Em humanos, a mutação natural no mesmo gene provoca a síndrome da poliendocrinopatia-enteropatia e imunodisregulação ligada ao X (IPEX), uma doença autoimune letal (Bennett *et al.*, 2001). O FoxP3 é essencial para diferenciação, sobrevivência e manutenção das células regulatórias (Fontenot e Rudensky, 2004; Ziegler, 2006). Esse fator de transcrição interage e coopera com diversos outros como o AML1, o NF- κ B, o Runx, a Smad-3 e o NFAT de forma a alterar o repertório transcricional da célula e promover a expressão de várias moléculas relacionadas à atividade das células regulatórias como o CD25 e o CTLA-4 dentre outros genes ligados a essa função (Ono *et al.*, 2007; Tone *et al.*, 2008). Foi observado que células T ativadas transfectadas com o gene do FoxP3 passaram a exercer atividade supressora (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Yagi *et al.*, 2004).

As células T regulatórias exercem suas funções de supressão da resposta imunológica, por meio de diversos mecanismos que podem depender do contato intercelular (expressão de CTLA-4, Fas-FasL, GITR e TGF- β na superfície celular)

ou por outros que são independentes de contato, como pela secreção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β ou pelo consumo de citocinas envolvidas no processo de proliferação celular como a IL-2 (Goleva *et al.*, 2005; von Boehmer, 2005; Vignali *et al.*, 2008).

Nos últimos anos intensificou-se o estudo da participação das células T regulatórias em diversas doenças, mas existem poucos estudos sobre o papel dessas células na PCM. O único trabalho, publicado recentemente (Cavassani *et al.*, 2006), demonstra que nos pacientes com a paracoccidioidomicose não há aumento no número de células CD4⁺CD25⁺ quando comparado ao número de células presentes em indivíduos saudáveis mas que estas, apresentam expressão aumentada de CTLA-4, LAP-1 (TGF- β de membrana), GITR e Foxp3. Outro resultado observado nesse trabalho foi o aumento da atividade supressora das células regulatórias isoladas do sangue periférico ou de lesões de pacientes sobre a proliferação de células alogênicas. Esses achados indicam que na PCM há o envolvimento das células T regulatórias no controle resposta ao patógeno e que estas células talvez estejam envolvidas na supressão da resposta imunológica celular observada.

Apesar do seu papel na PCM ainda ser pouco estudado, em outras doenças (infecciosas ou não infecciosas) as células T regulatórias têm demonstrado participar de maneira efetiva e importante, tanto no que se refere à suscetibilidade como na resistência a doenças, sendo esta última atividade exercida principalmente pelo controle de uma resposta inflamatória exacerbada.

Na filariose provocada por *Brugia malayi* observa-se uma supressão na resposta mediada por linfócitos T e aumento de expressão de CTLA-4. Em animais infectados por esse parasita ocorre um aumento do número de células T regulatórias (T CD4⁺Foxp3⁺CD103⁺) circulantes e no lavado peritoneal (McSorley *et al.*, 2008). A análise funcional dessas células regulatórias mostra também forte atividade supressora sobre células TCD4⁺ naíves, indicando que, a imunossupressão observada nos pacientes possa ser dependente da atividade de células regulatórias.

Na leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* observa-se a presença de uma população TCD4⁺CD25⁺ expressando GITR, CTLA-4 e FoxP3 nas lesões de pacientes, capazes de suprimir *in vitro* a proliferação de células T, bem como de produzir grandes quantidades de IL-10 e TGF-β, atuando no controle da função de células T no sítio da infecção (Campanelli *et al.*, 2006). Na tuberculose humana, Guyot-Revol *et al.* (2006) observaram um número aumentado de células T regulatórias na circulação periférica de pacientes com a doença ativa, em comparação a indivíduos saudáveis, assim como o aumento da expressão do RNAm para IL-10 e TGF-β, sendo que após a depleção *ex vivo* das células T regulatórias em culturas foi observado o aumento da produção de IFN-γ.

Como mencionado, as células T regulatórias também apresentam um papel importante no controle da reação inflamatória exacerbada. Na esquistossomose mansônica experimental essas células se mostram capazes de conferir resistência à doença, prolongando a sobrevivência dos animais infectados (Hesse *et al.*,

2004). Também foi observada a atividade reguladora destas células na leishmaniose reduzindo o tamanho e carga parasitária nas lesões (Xu, D. *et al.*, 2003).

Além do seu papel na resposta imunológica em doenças infecciosas, as células regulatórias apresentam papel preponderante no controle da resposta em doenças autoimunes (Costantino *et al.*, 2008; Piccirillo, 2008). Em modelos experimentais, a transferência de células CD4⁺CD25⁺ impede o desenvolvimento da tireoidite em ratos BB, que desenvolvem a doença espontaneamente e que, embora apresentem quantidades normais de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no timo apresentam números reduzidos dessas células na periferia. Na asma experimental a transferência de células regulatórias também é capaz de suprimir a doença, ao passo que a depleção dessas células leva ao desenvolvimento de uma doença mais grave (Burchell *et al.*, 2008).

Ainda não estão totalmente estabelecidos os mecanismos que levam a expansão de células regulatórias naturais ou a geração de células regulatórias induzidas. O TGF- β parece uma importante citocina para a indução periférica de células com caráter regulador (Levings *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Outro mecanismo provável é a produção de cinureninas através da quebra do triptofano pela enzima Indoleamina 2,3-Dioxigenase (IDO). A IDO é uma enzima bastante expressa por células dendríticas plasmocitóides, que são capazes de converter células CD4⁺CD25⁻ em células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. O mecanismo para a indução dessa população por células dendríticas plasmocitóides foi recentemente elucidado através de experimentos que demonstraram a necessidade da ação da enzima IDO para a geração de células

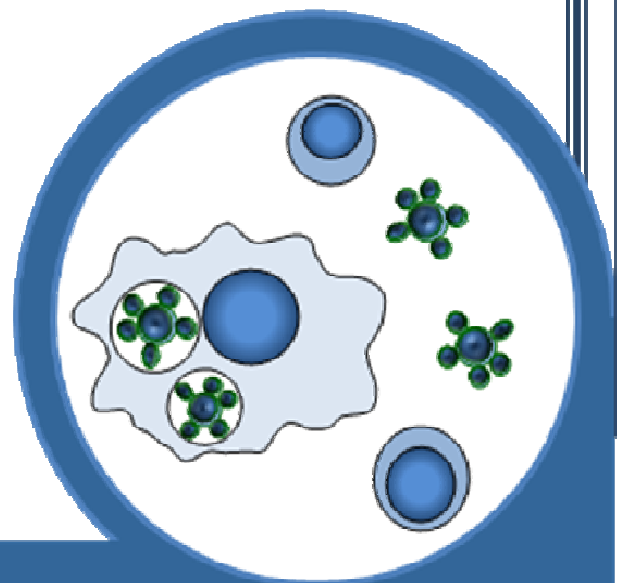
regulatórias (Chen *et al.*, 2008). Além da IDO têm sido descritos outros mecanismos pelos quais células dendríticas induzem células regulatórias. No intestino células dendríticas na presença de ácido retinóico inibem a diferenciação de células Th-17 e promovem a conversão de células CD4⁺ em células Foxp3⁺ com caráter supressor (Mucida *et al.*, 2007).

Recentemente Suttmuller *et al.* (2006) demonstraram que o receptor do tipo Toll-2 (TLR2) apresenta um papel de extrema importância na indução de expansão e no controle das funções de células T regulatórias (Suttmuller *et al.*, 2006). Na infecção experimental por *Candida albicans*, foi demonstrado que a ausência do TLR2 (nocaute) gerou uma resistência à infecção pelo fungo, e que essa resistência estava associada à diminuição do número de células T regulatórias naturais e consequentemente da liberação de IL-10 (Netea *et al.*, 2004).

Como mencionado, existe um único trabalho relatando a participação das células T regulatórias na paracoccidiodomicose humana (Cavassani *et al.*, 2006). Contudo, ainda não foi demonstrado por meio de qual mecanismo essas células exercem suas funções e se após o tratamento antifúngico efetivo há uma diminuição no número e função dessas células, como sugere a recuperação da capacidade de resposta imunológica dos pacientes. Dessa forma, temos como hipótese que a supressão da resposta imunológica celular em pacientes com paracoccidiodomicose possa ser mediada, ao menos em parte, pela presença de um número elevado de células regulatórias naturais na circulação periférica dos pacientes com paracoccidiodomicose, que estariam atuando por meio de mecanismos a serem elucidados. Estes mecanismos de supressão poderiam estar

comprometendo em maior ou menor grau a resposta imunológica nas formas adulta e juvenil da doença, condição que deve ser revertida com o tratamento efetivo da infecção.

Objetivos



2 OBJETIVOS E ABORDAGEM EXPERIMENTAL

2.1 Objetivos

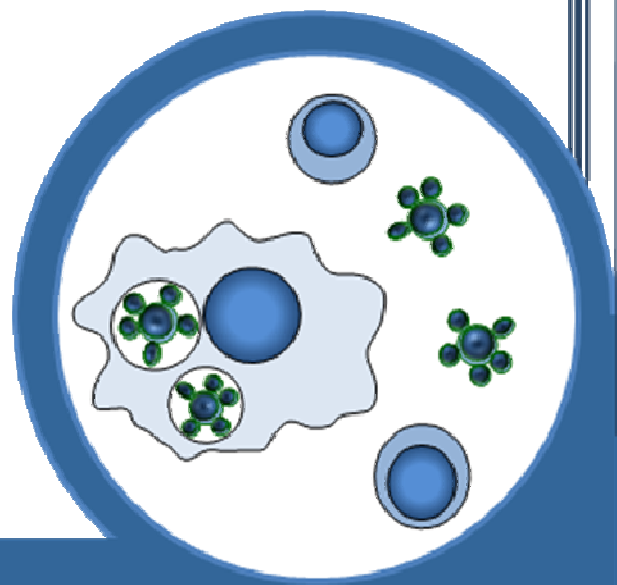
Avaliar a possível participação das células T CD4⁺CD25⁺ na supressão da resposta imunológica observada em pacientes com paracoccidioidomicose antes e após o tratamento antifúngico, assim como avaliar possíveis mecanismos pelos quais essa supressão é exercida.

2.2 Abordagem Experimental

- Verificar se ocorre aumento do número de células T CD4⁺CD25⁺ na circulação periférica de pacientes com paracoccidioidomicose ativa, em comparação a indivíduos saudáveis, por meio da fenotipagem de células utilizando marcadores de superfície (CD25, GITR, CD38, CD103, CD62L, TGF-β1) e intracelulares (FoxP3 e CTLA-4) por citometria de fluxo, assim como por meio da análise da expressão gênica de FoxP3 por Q-RT-PCR.
- Determinar se o tratamento efetivo da doença leva a alterações no número e no fenótipo das células regulatórias circulantes (conforme mencionado no item anterior).
- Avaliar a atividade supressora das células T CD4⁺CD25⁺ isoladas de pacientes com a doença ativa, após o tratamento efetivo e controles saudáveis, por meio de testes de proliferação celular, bem como se o mecanismo envolvido na supressão depende ou não de contato intercelular.

- Avaliar (*in vitro*) os possíveis mecanismos utilizados pelas células regulatórias para mediar a supressão da resposta imunológica celular, por meio da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura (TGF- β , IL-10, IFN- γ e IL-2) em células estimuladas ou não com ConA e cAg (antígeno celular de *P. brasiliensis*), depletadas ou não de células T regulatórias.
- Avaliar o papel das citocinas supressoras IL-10 e TGF- β na supressão da resposta proliferativa exercida pelas células T regulatórias, por meio do uso de citocinas recombinantes e anticorpos anti-citocinas.

Material e Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos nesse estudo pacientes com a forma juvenil (FJ) e adulta (FA) da PCM, atendidos nos ambulatórios de pneumologia, moléstias infecciosas e de dermatologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Foram considerados pacientes do grupo “doença-ativa” (DA) aqueles incluídos antes do início (pós-diagnóstico) ou no máximo com 1 mês de tratamento, que ainda apresentavam sintomas e exames compatíveis com paracoccidioidomicose em atividade. Os pacientes do grupo tratado (DT), foram selecionados dentre aqueles que estão há pelos menos 3 meses sem tratamento, e que não apresentam nenhum sintoma ou exame laboratorial indicativo de doença em atividade. Os indivíduos do grupo controle (C) foram selecionados na zona endêmica de Campinas, principalmente no Bairro de Barão Geraldo (fazendas e hortas), próximo ao campus da UNICAMP e que apresentaram resultado negativo para o teste de hipersensibilidade tardia para antígenos fúngicos. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências médicas da Unicamp e aprovado (parecer nº 584/2006, **CAAE**: 0462.0.146.000-06) e todas as coletas foram feitas com o consentimento de pacientes e indivíduos controles conforme termo de consentimento (ver item 8.3 em “Anexo”).

3.2 Obtenção do antígeno celular de *P.brasiliensis* (cAg)

Células leveduriformes (cepa B339) obtidas após 7 dias de crescimento em meio Fava-Neto, serão homogeneizadas por 1 minuto em banho de gelo, sonicadas em 3 ciclos de 1 minuto e incubadas por uma noite a 4°C, sob agitação lenta e contínua. A mistura será então centrifugada a 10.000 RPM por 30 segundos a 4°C. O sobrenadante obtido será dializado por 24h em tampão Tris-HCl 0.02M (pH 8.1) com 2 trocas e a preparação obtida (cAg) será avaliada quanto ao conteúdo protéico pelo método de Bradford e caracterizada por gel de poliacrilamida e coloração pela prata.

3.3 Determinação da porcentagem e do fenótipo de células T CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico por citometria de fluxo

Para a determinação da porcentagem e do fenótipo das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no sangue periférico dos pacientes (com doença ativa ou tratados) e do grupo controle foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, em amostras de sangue total. Para isso, 1 mL de sangue total foi misturado com 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACs Lysing solution-BD), incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o tubo foi centrifugado (1250 rpm por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante descartado, o “pellet” de células foi então ressuspensionado em 500 µL de tampão de diluição (PBS-BSA (0,1%)-NaN₃ (0,2mM)). Após esse procedimento, 50 µL da suspensão de células foram

distribuídos em placas de 96 cavidades com fundo em U, contendo os anticorpos para marcação de superfície: anti-CD3 (FITC ou PE ou CyCh todos da marca Caltag), anti-CD4 (FITC ou PE ou CyCh), anti-CD25 (PE ou CyCh), anti-GITR (FITC ou PE), anti-CD62L (FITC), anti-CD38 (FITC), anti-CD103 (PE), anti CCR5 (PE), anti CD95L (PE), anti CD95 (FITC), anti-TGF- β 1 (LAP - biotinilado) e anti-TLR2 (biotinilado), assim como os anticorpos utilizados como controle de isotipo, diluídos no tampão de diluição. Após 15 minutos de incubação a 4°C no escuro, foram adicionados 150 μ L de tampão de diluição, centrifugando-se por 10 minutos a 1250 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas (vortex), adicionando-se 200 μ L de tampão de diluição, seguido de nova centrifugação (10 minutos a 1250 rpm a 4°C). Após o descarte do sobrenadante, as células marcadas com anticorpos biotinilados foram ressuspensas e incubadas com estreptavidina marcada com PE por 15 minutos a 4°C no escuro. Após a incubação foi feita uma lavagem com 150 μ L do tampão de diluição. Em seguida as células foram ressuspensas, sendo adicionados 200 μ L de formaldeído 2%, seguido de incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. A placa foi centrifugada novamente (10 minutos a 1250 rpm a 4°C), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200 μ L de tampão de diluição. Após nova centrifugação, foram adicionados 150 μ L do tampão de permeabilização (PBS-Saponina (0,5%) - PBS-S), misturando-se cuidadosamente e incubando-se à TA por 10 minutos. Após a centrifugação foram incluídos os anticorpos anti-FoxP3 (Biolegend) e anti-CTLA-4 (BD Pharmigen) marcados com PE, diluídos em PBS-S, incubando-se por 30 minutos à TA no escuro. Após a incubação foram

adicionados 150 μ L de PBS-S, seguido de centrifugação. As células foram ressuspensas novamente em PBS-S (150 μ L) e novamente centrifugadas. A seguir foram colocados 200 μ L de tampão de diluição e a placa centrifugada (10 minutos a 1250 rpm a 4°C), as células foram então ressuspensas em 300 μ L de PBS-formaldeído 2%. Após a transferência para tubos apropriados, a leitura foi feita em citômetro de fluxo (FACScalibur/Becton & Dickson). Para cada amostra um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos. A análise dos resultados foi executada em programa específico (FSC Express v.3.00.0320 – De Novo Software), sendo analisada a porcentagem de células positivas, assim como a Média de Intensidade de Fluorescência (“**Mean Fluorescence Intensity**” - MFI) de cada marcador, conforme a estratégia exemplificada na figura abaixo (figura I).

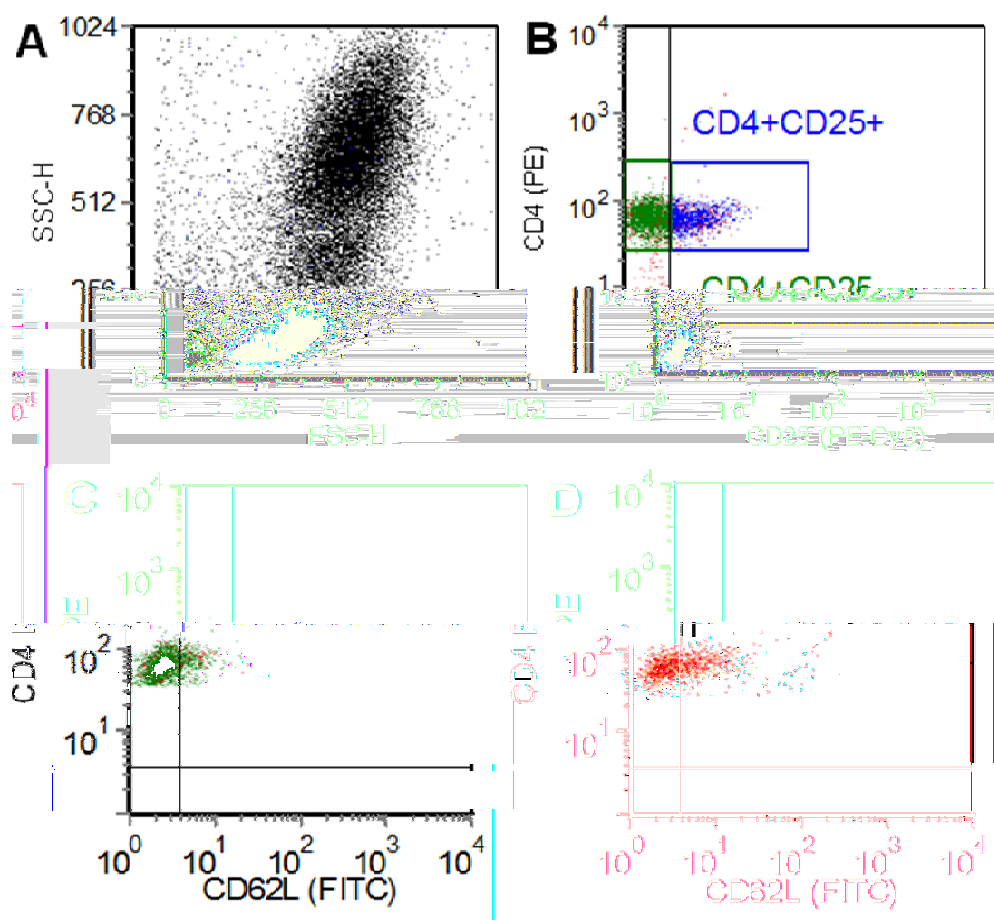


Figura 3.1: Estratégia utilizada para a análise da expressão de marcadores específicos em células $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^-$. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo dot-plot, no qual a população de linfócitos foi determinada de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A), sendo então delimitada a região R1 (linfócitos). A partir desse gráfico foi gerado outro “dot-plot” no qual foi visualizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 (B). Nesse gráfico foram então delimitadas as populações de células $CD4^+CD25^+$ (R2) e $CD4^+CD25^-$ (R3). Para a análise final foram gerados novos gráficos a partir da combinação das regiões R1 e R2 ou R1 e R3, nos quais se analisou a expressão dos demais marcadores: FoxP3, CTLA-4, GITR, LAP-1, CD62L, TLR-2, CD38, CD95, CD95L, CD103 e CCR5 (na figura acima estão representados os resultados obtidos para expressão de CD62L. Os resultados finais foram expressos como a porcentagem de células positivas para cada parâmetro.

3.4 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleares foram separadas do sangue periférico (coletado por punção venosa em tubos contendo heparina sódica) por meio de gradiente de Ficoll-Hypaque. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de 15 mL contendo uma solução de Ficoll-hypaque (GE HealthyCare 5 mL) e centrifugado a 2300 rpm durante 30 minutos. A fração contendo as CMSP foi coletada e as células submetidas a duas lavagens com PBS (1250 rpm, por 10 minutos a 4°C). As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI e contadas em câmara de Neubauer.

3.5 Separação magnética da população CD4⁺CD25⁺

As células T CD4⁺CD25⁺ foram separadas das CMSP de acordo com a expressão de marcadores de superfície, por meio de separação imunomagnética. Após a contagem, as CMSP foram contadas e ressuspensas (1 x 10⁷ células) em 80 µL de tampão de separação (PBS-BSA (0,5%)-EDTA (2mM) – PBS-B-E), sendo submetidas em uma primeira etapa à depleção de células CD4 negativas, por meio da incubação com uma mistura de anticorpos biotinilados (anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123, anti-TCRγ/δ, anti-glicoforina A, Miltenyi Biotec), por 10 minutos a 4°C. Após a incubação foi adicionado o anticorpo anti-biotina acoplado a esferas magnéticas e as células foram incubadas por 15 minutos a 4°C. As células foram então lavadas (em 10 mL de PBS-B-E a 300 x g, por 10 minutos a 4°C), ressuspensas em 500 µL de tampão e passadas em coluna de separação magnética (colunas LD, Miltenyi

Biotec). A fração não retida pela coluna (seleção negativa de células $CD4^+$) foi coletada, centrifugada ($300 \times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$), ressuspenida em $90 \mu L$ de tampão (PBS-B-E) e incubada com anticorpo anti-CD25 acoplados a esferas metálicas por 15 minutos a $4^\circ C$. Após a incubação, as células foram lavadas novamente e ressuspendidas em $500 \mu L$ do tampão e passadas em colunas para separação positiva (colunas LS). Após a separação foram obtidas 2 frações: células $CD4^+CD25^-$ e células $CD4^+CD25^+$, que foram contadas e tiveram a viabilidade estimada pela coloração com azul de tripan. Os resultados obtidos através da separação acima descrita estão abaixo exemplificados como resultados típicos de uma separação imunomagnética, analisada por citometria de fluxo. De maneira geral obtivemos populações celulares com pureza variando de 90-95% (exemplos na figura 3.2).

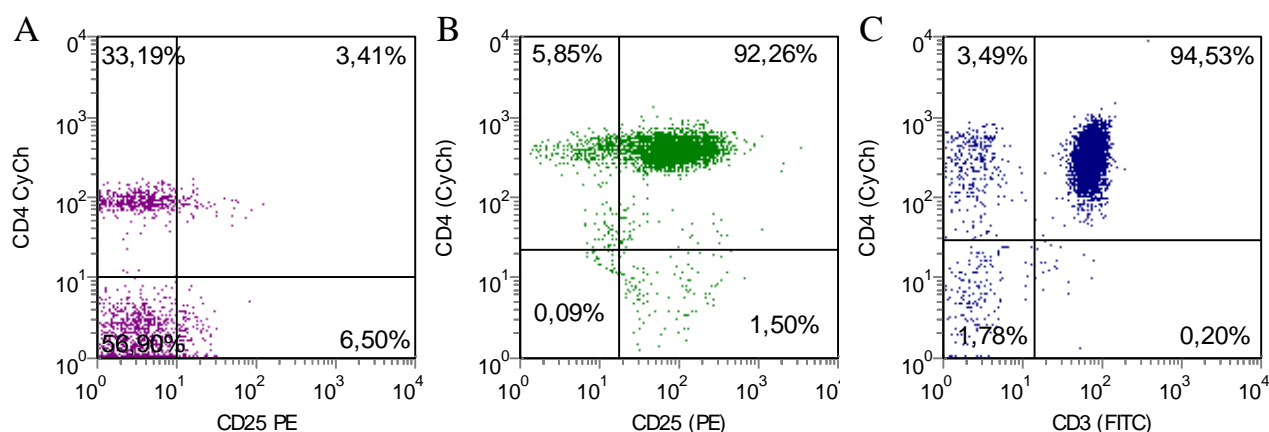


Figura 3.2 - “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da composição celular de CMSP antes **(A)** e após o procedimento de separação imunomagnética **(B e C)**. **A)** Análise da porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ (quadrante superior-direito) em CMSP antes da separação. **B)** Análise da porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ (quadrante superior-direito) após a separação. **C)** Análise da porcentagem de células $CD4^+CD25^-$ (quadrante superior-direito) após a separação. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante.

3.6 Marcação das células com CFSE

As células mononucleares de sangue periférico e as populações celulares separadas previamente foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas durante 5 minutos com CFSE (concentração final de 1,5 μ M/mL, Sigma Aldrich) e a seguir a reação foi interrompida pela adição de solução contendo soro fetal bovino (RPMI-SBF 10%). As células foram centrifugadas a 1250 rpm durante 10 minutos, ressuspensas em PBS e novamente centrifugadas (1250 rpm por 10 minutos a 4°C). Após a marcação, as células foram utilizadas para avaliar a atividade regulatória das células CD4⁺CD25⁺ sobre as outras populações por meio da inibição de proliferação.

3.7 Avaliação da atividade supressora das células T CD4⁺CD25⁺ (inibição da proliferação) em coculturas convencionais e em sistema “transwell”

Foram realizadas coculturas para a avaliação do papel supressor das células CD4⁺CD25⁺ sobre a proliferação de linfócitos T CD4⁺. Para isso as CMSP alogênicas ou células T CD4⁺CD25⁻ autólogas obtidas conforme descrito acima e marcadas com CFSE, foram estimuladas com concanavalina A (5 μ g/mL, Sigma Aldrich) ou antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg – 10 μ g/mL – somente células T CD4⁺CD25⁻ autólogas) por 96 horas na presença ou ausência das células

CD4⁺CD25⁺ ou células CD4⁺CD25⁻ (obtidas dos diferentes grupos de indivíduos) em diferentes proporções (1:2, 1:4 e 1:10). Após esse período, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4 (CyCh) conforme descrito acima e submetidas a análise em citômetro de fluxo. A proliferação foi avaliada de acordo com a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE obtido em cada amostra (conforme exemplificado na figura 3.3 abaixo). Para avaliar se o contato intercelular é importante para a supressão da proliferação, foram feitas coculturas com as mesmas condições, mas com as células CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻ mantidas em sistema “transwell” (placa de 96 poços Nunc, membrana de 0,4 µm).

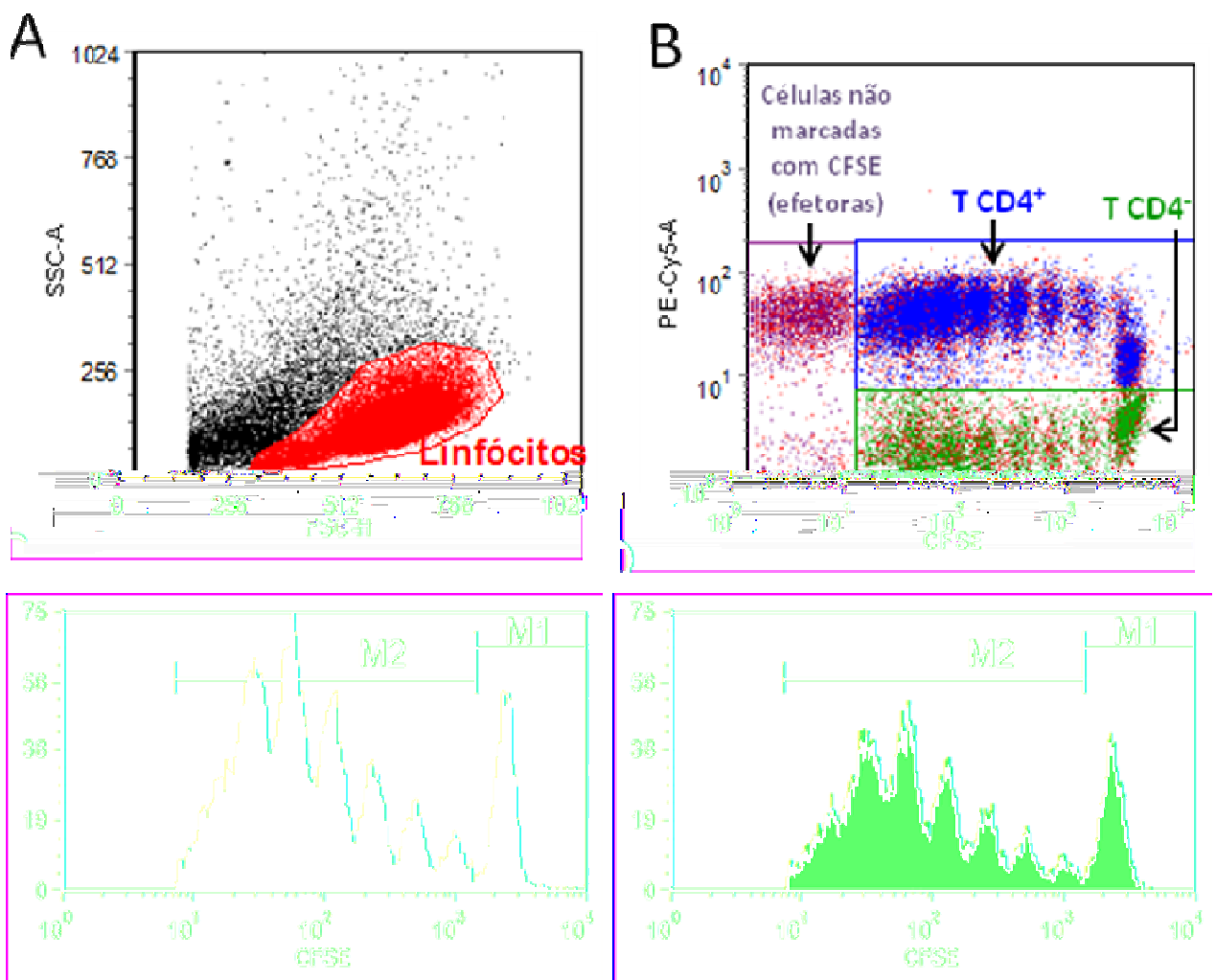


Figura 3.3 Página anterior: Estratégia utilizada para analisar o fenótipo de células T com atividade supressora no sangue periférico. A região de linfócitos (em repouso ou blastos - em vermelho em **A**) foi determinada pela sua distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) (**A**). A partir desse gráfico foi gerado um outro “dot-plot” (**B**) com a análise das fluorescências (anti-CD4 – CyCh e CFSE), no qual as populações de células T CD4⁺ (em azul) e T CD4⁻ (em verde) foram selecionadas pela delimitação de outras regiões. Por meio da combinação das regiões de linfócitos e das células T CD4⁺ ou T CD4⁻ foram gerados histogramas (**C** e **D** respectivamente) nos quais foram analisadas as porcentagens de células em proliferação (região M2). No “dot-plot” **B** é possível observar as células não marcadas com CFSE (células TCD4⁺CD25⁺ ou TCD4⁺CD25⁻ efetoras provenientes de pacientes ou controles normais, que não foram incluídas na análise de proliferação).

3.8 Avaliação da participação da produção e consumo de citocinas na inibição da proliferação mediada por células T CD4⁺CD25⁺.

Para avaliar qual o papel desempenhado pelas citocinas na supressão da resposta mediada pelas células T CD4⁺CD25⁺ na proliferação de CMSP alogênicas, após a separação as CMSP foram cultivadas na presença ou na ausência de células CD4⁺CD25⁺ e foram tratadas com citocinas recombinantes (IL-10 – 2 ng/mL e TGF-1 ng/mL, isoladamente ou combinadas e com IL-2 – 0,5ng/mL todos da marca Peprotech) ou com anticorpos neutralizantes (anti-TGF- β 1 – 1 ng/mL e anti-IL-10 - 2 pg/mL, R&D Systems, isoladamente ou combinadas e anti-IL-2 100ng/mL ou anti-CD25 –1 μ g/mL - Peprotech) e avaliadas quanto à proliferação (conforme descrito no item anterior).

3.9 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas

Para avaliar se a presença de células CD4⁺CD25⁺ influencia na produção de citocinas em culturas de CMSP alogênicas ou em culturas de células CD4⁺CD25⁻, foram realizadas culturas para a produção de sobrenadantes. Para isso 2 x 10⁶ células/mL de CMSP ou células T CD4⁺CD25⁻ foram cultivadas por 48 horas, estimuladas ou não com ConA (5 µg/mL) ou cAg (antígeno celular de *P. brasiliensis* - 1µg/mL), na presença ou ausência de células T CD4⁺CD25⁺. Após esse período os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e armazenados a -80°C até o momento da dosagem de citocinas. A dosagem de citocinas (IL-10 e TGF-β1) foi realizada por meio de ELISA (kits DuoSet, R&D Systems) conforme as especificações do fabricante.

3.10 Avaliação da expressão gênica de FoxP3, IL-10 e TGF-β

3.10.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA.

O RNA total de parte (2x10⁶ células) das PBMC obtidas *ex vivo* foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) conforme instruções do fabricante e quantificado por meio de espectofotômetro (Nanodrop –Thermo Scientific) com leituras a 260 e 280 nm. As amostras de RNA foram então tratadas para a remoção de DNA genômico. Para tanto, 1µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,7µL e foram acrescentados 3,97µL do mix contendo 2,97µL de tampão 10x concentrado e 1µL de DNase (Ambion). Então foi

adicionado 0,3µL de EDTA pH 8.0 - 0,5M e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 75°C para remoção da atividade enzimática da DNase.

Para a síntese do cDNA, ao RNA tratado foi adicionado 1µL de oligo dT₁₂₋₁₈ e 1µL de “primers” randômicos (Applied Biosystems). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18 µL de um “mix” composto por: 10 µL de tampão de síntese; 2,5 µL de dNTP (10mM); 5 µL de DTT (0,1M) e 0,5 µL de superscript R/T II (200U/µL - (Invitrogen)). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, e a seguir a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi removida incubando-se a 90°C por 5 minutos, seguido por incubação a 4°C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada rapidamente, adicionando-se 1 µL de RNase humana, incubando-se a 37°C por 20 minutos, para a remoção das moléculas restantes de RNA. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.10.2 Q-RT-PCR

O Q-RT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen. Em cavidades de placas de 100µL foram adicionados 3 µL de cDNA (ou de água no caso do controle negativo), 1 µL do primer sense e 1 µL do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM (previamente titulados) e 5 µL do master mix, contendo dNTP, Taq polimerase, MgCl₂, SybrGreen, e tampão (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems). As amostras foram colocadas no aparelho de PCR em

tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de “melting” (aquecimento gradual da amostra amplificada 60° C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a formação de apenas um tipo de “amplicon”. Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse (FoxP-3, IL-10 e TGF-β) de cada amostra, utilizando como gene normalizador Ubiquitina (UBC). Os resultados são expressos como concentração relativa obtida por meio do cálculo do $\Delta\Delta CT$ de cada amostra (Livak e Schmittgen, 2001). Primers para Foxp3: (sense: 5'-GAA ACA GCA CAT TCC CAG AGT TC-3'; anti-sense: 5'-ATG GCC CAG CGG ATG AG-3'); primers para UBC: (sense: 5'-ATT TGG GTC GCG GTT CTT G-3'; anti-sense: 5'-TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT -3'); IL-10 (sense: 5' – GGC CAG GGC ACC CAG TCT –3'); (anti-sense: TCG AAG CAT GTT AGG CAG GTT) e TGF-β: (sense: 5'-TGA GGG CTT TCG CCT TAG C-3'); (anti-sense: CGG TAG TGA ACC CGT TGA TGT-3') todos obtidos da MGW.

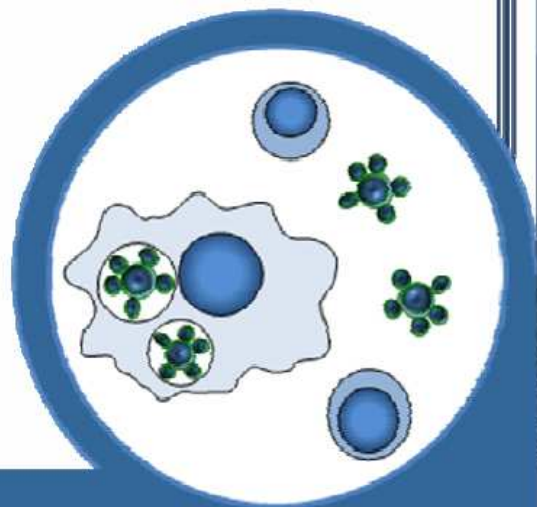
Os resultados das padronizações das concentrações de primers e da eficiência das reações para cada um dos genes analisados estão demonstrados no item apêndice.

3.11 Análise estatística

A comparação da variação dos diversos parâmetros nos diferentes grupos analisados foi realizada com o teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para

a comparação de dois grupos foi utilizado o teste t de student. Quando foram realizados testes comparando diferentes tratamentos para uma mesma amostra foram utilizados os testes de ANOVA para medidas repetidas ou teste t pareado. Os testes foram realizados com o software SigmaStat v1.0 (Jandel Corporation) e foram considerados significantes os resultados com valores de $p \leq 0,05$.

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ presentes no sangue periférico.

Como pode ser observado na figura 4.1 abaixo, a partir da análise por citometria de fluxo do sangue periférico dos diferentes grupos incluídos no estudo, pacientes com paracoccidiodomicose ativa (DA) apresentam uma maior porcentagem de células T $CD4^+CD25^+$ quando comparados a pacientes tratados (DT) ou controles normais.

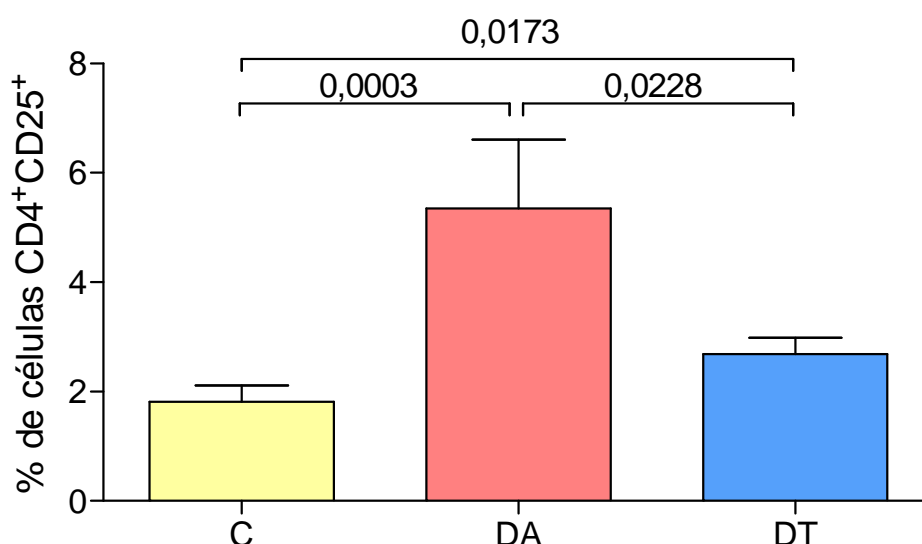


Figura 4.1 – Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ presentes no sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (DA – n=14), tratados (DT – n=13) e controles normais (C – n=13). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Dados expressos como média \pm SEM. Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni – os valores de *p* estão destacados no gráfico.

Dado que células CD4⁺ que expressam o receptor para IL-2 (CD25) podem ser células convencionais ativadas, a população CD4⁺CD25⁺ foi avaliada quanto à expressão de Foxp3. Na figura abaixo (figura 4.2) é possível notar uma porcentagem significativamente maior de células Foxp3⁺ dentre as células CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a doença ativa em comparação aos indivíduos do grupo controle. A expressão desse marcador tende a diminuir com o tratamento da doença e melhora clínica do paciente, embora não haja diferenças estatisticamente significativas entre o grupo DA e DT, observa-se uma tendência indicando uma queda no número de células CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ nos pacientes tratados.

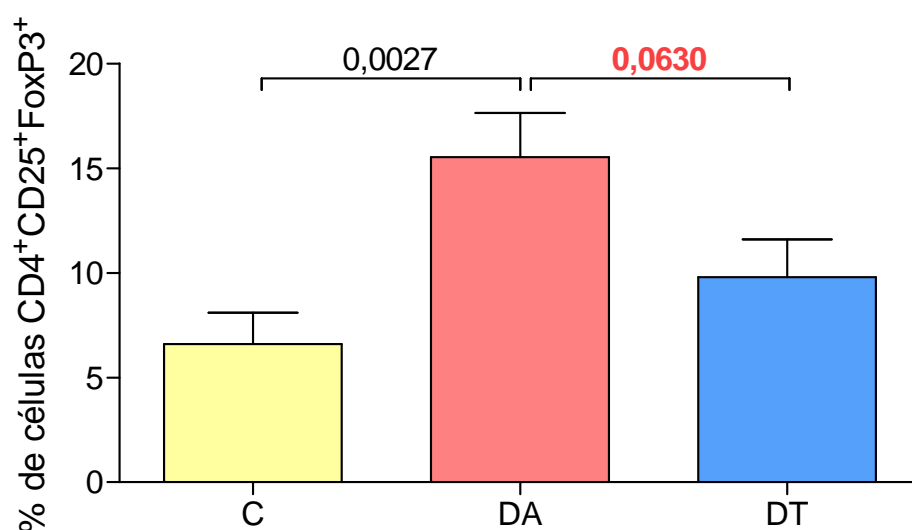


Figura 4.2 – Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ do sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (DA – n=14), tratados (DT – n=13) e controles normais (C – n=13). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Dados expressos como média ± SEM. Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni – os valores de *p* estão destacados no gráfico.

4.2 Análise da expressão do RNA mensageiro para FoxP3 em células mononucleares do sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa e controles normais.

Com o intuito de confirmar o aumento do número de células regulatórias na circulação periférica de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa utilizamos a metodologia de quantificação relativa de RNA mensageiro por PCR em tempo real (Q-RT-PCR). Na figura abaixo (figura 4.3) pode se observar que os indivíduos apresentando paracoccidiodomicose ativa (DA) apresentam em média uma expressão relativa 4 vezes maior do RNA mensageiro para FoxP3 do que aquela observada no sangue periférico de indivíduos controle e pacientes após o tratamento antifúngico efetivo. Esses dados confirmam os resultados obtidos por citometria de fluxo.

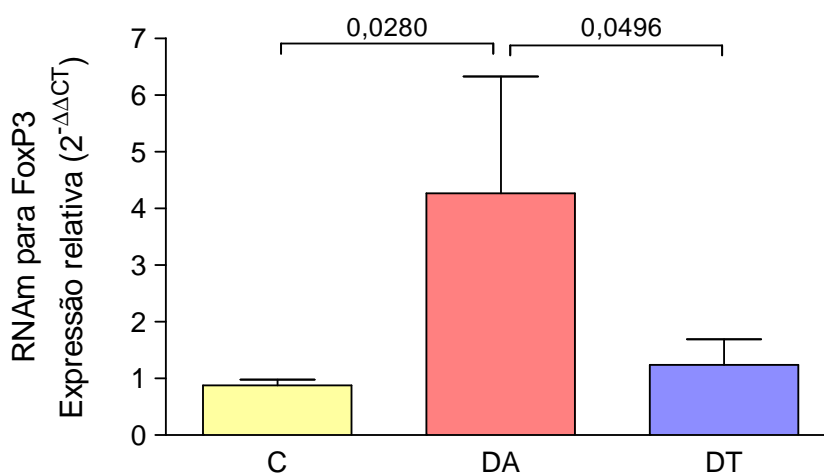


Figura 4.3 – Análise da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) do RNA mensageiro para FoxP3 em células mononucleares do sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos controle (C – n=10) ou de pacientes com paracoccidiodomicose ativa (DA – n=10) ou tratada (DT – n=7). Os valores foram normalizados pela expressão do RNA mensageiro do gene da Ubiquitina (UBC). Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão destacados no gráfico.

4.3 Caracterização fenotípica das células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ presentes no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e controles normais.

Com o intuito de melhor caracterizar a população de células CD4⁺CD25⁺ encontrada no sangue periférico de pacientes e controles, foram avaliadas a expressão de marcadores relacionados e expressos por células T regulatórias como o CD152 (CTLA-4), CD38, GITR, CD62L, LAP-1 (TGF- β de superfície), TLR-2, CD95, CD95L, CD103 e CCR5. A análise dos diferentes parâmetros foi realizado conforme exemplificado em materiais e métodos. Os resultados demonstraram que as células CD4⁺CD25⁺ (independentemente do grupo analisado) apresentam uma maior expressão de marcadores relacionados às células T regulatórias do que a população CD4⁺CD25⁻, confirmando assim a natureza dessa população. Quando a expressão desses diferentes marcadores foi comparada entre os grupos analisados, pudemos observar que as células CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a doença ativa (DA) apresentam uma maior expressão de CD38, CD95L, CD152 (CTLA-4) e GITR do que as células de pacientes tratados (DT) ou do grupo controle (C) figura 4.4A. Em relação aos outros marcadores foi observada expressão aumentada de LAP-1 (TGF- β de superfície) em células de pacientes com a doença ativa (DA) somente em comparação aos controles, e expressão aumentada de TLR-2 nesse grupo em relação aos pacientes tratados. Não observamos diferenças estatísticas em relação aos outros marcadores, mas como mencionado, foi possível observar uma

maior expressão, principalmente de CD103, CD95 e CCR5, nas células CD4⁺CD25⁺ (figura 4.4A) do que nas células CD4⁺CD25⁻ (figura 4.4B).

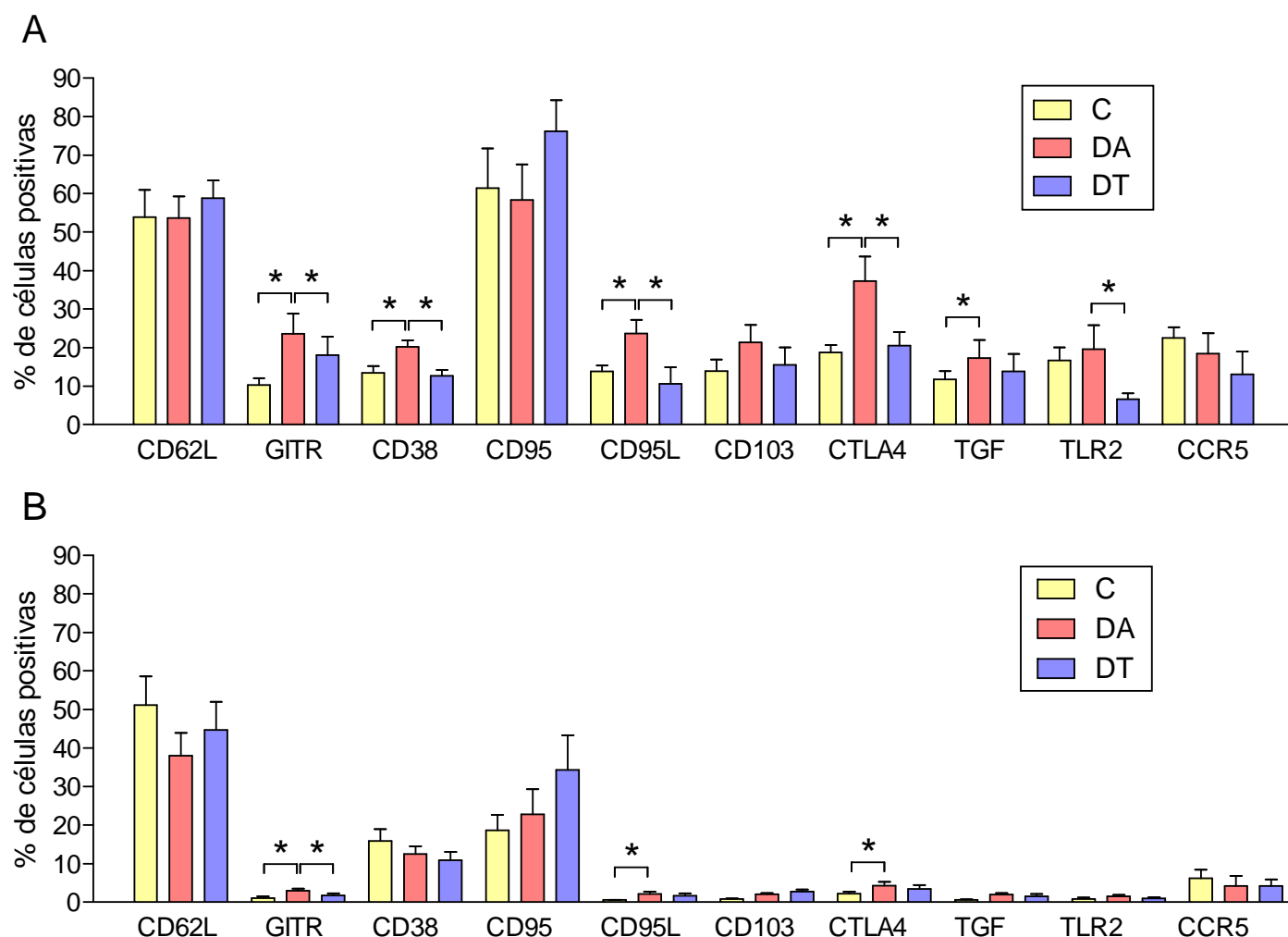


Figura 4.4 – Análise por citometria do fenótipo de células CD4⁺CD25⁺ **(A)** ou CD4⁺CD25⁻ **(B)** no sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (DA – n=14), tratados (DT – n=13) e controles normais (C – n=13). A porcentagem dos marcadores (CD62L, GITR, CD38, CD95, CD95L, CD103, CD152 (CTLA-4), LAP-1 (TGF), TLR-2 e CCR5) nas duas populações de células foi realizada conforme descrito em material e métodos. Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni - *p≤0,05.

4.4 Avaliação da atividade supressora de células CD4⁺CD25⁺ de pacientes com paracoccidiodomicose e controles normais.

Para avaliarmos a atividade supressora das células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ obtidas dos diferentes grupos incluídos no estudo, foram realizadas coculturas de CMSP alogênicas (doadores normais) estimuladas com concanavalina A e células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ provenientes de pacientes com a doença ativa (DA) ou tratada (DT) e controles normais (C). As CMSP foram previamente marcadas com CFSE e estimuladas por 96 horas, após este tempo, as células foram marcadas com anticorpos para imunofluorescência (anti-CD4) e analisadas em citômetro de fluxo. A análise da proliferação das CMSP foi realizada nas duas populações, células T CD4⁺ e CD4⁻ (figura 4.5). Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de células em proliferação, avaliados pela diminuição na intensidade de fluorescência do CFSE conforme descrito em materiais e métodos.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.5) as células CD4⁺CD25⁺ provenientes de todos os grupos analisados (DA, DT e C), foram capazes de inibir a proliferação tanto da fração de células T CD4⁺ (figura 4.5A), como da fração T CD4⁻ (figura 4.5B) das CMSP alogênicas estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA). Também pudemos observar que essa supressão foi dependente do número de células CD4⁺CD25⁺, ou seja, foi mais evidente quando se utilizou uma maior proporção de células regulatórias em relação às CMSP (razão 1:2 = 1 célula CD4⁺CD25⁺: 2 CMSP).

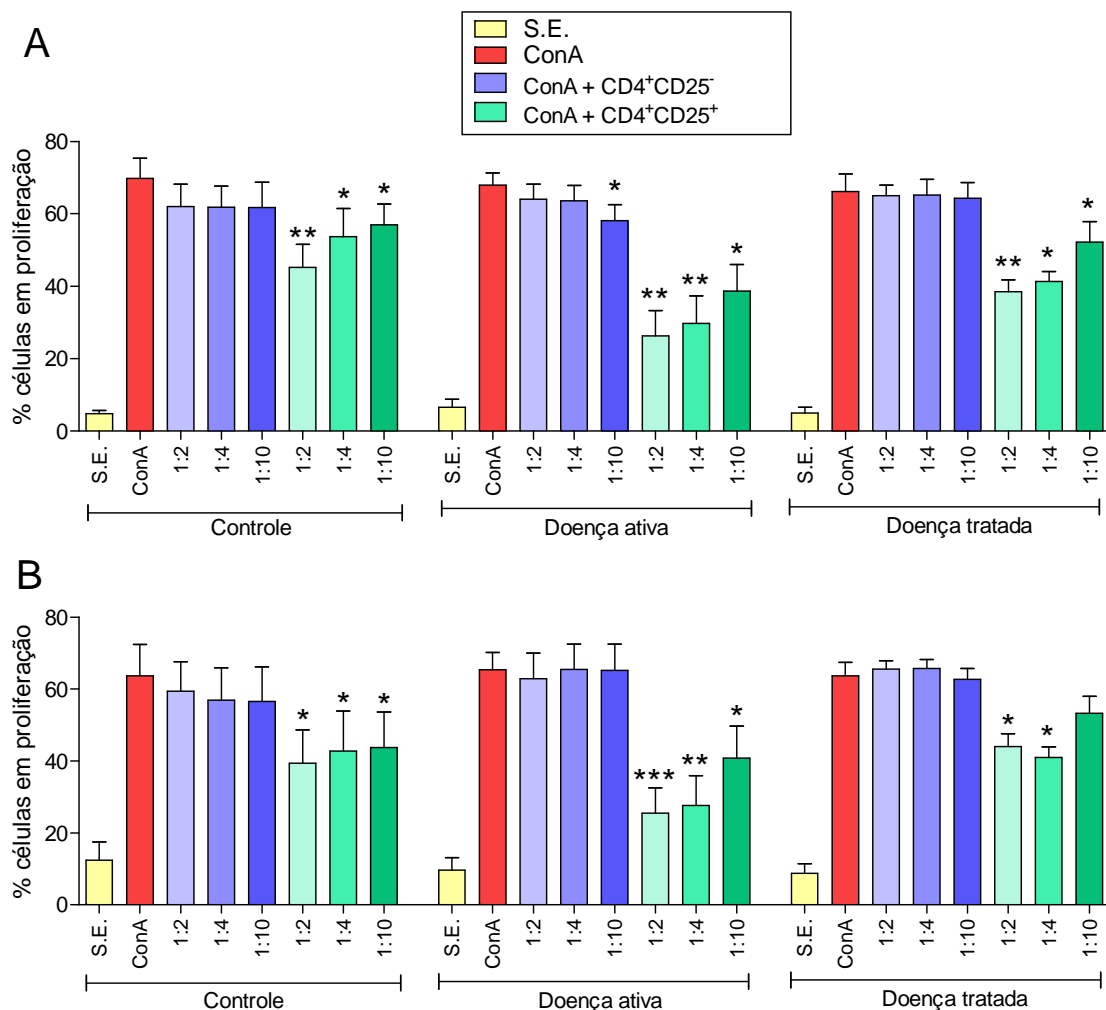


Figura 4.5 – Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4⁺ (A) ou T CD4⁻ (B), provenientes de CMSP de doadores normais na presença de células CD4⁺CD25⁻ ou CD4⁺CD25⁺ alôgenas provenientes de controles normais (n=9), e pacientes apresentando paracoccidioidomicose ativa (n=5) ou tratada (n=6). As CMSP alôgenas foram cultivadas sem estímulo (S.E.) ou estimuladas com concanavalina A (ConA – 5 µg/mL) na presença ou não de um número variável de células CD4⁺CD25⁺ e após 96 horas de cocultura coletadas e marcadas com anti-CD4. Os dados estão expressos como a porcentagem de células que sofreram proliferação dada pela queda da intensidade de fluorescência emitida pelo CFSE. Teste estatístico: ANOVA para medidas repetidas - *p≤0,05 em relação às células estimuladas com ConA.

Com o intuito de analisar a atividade direta de células CD4⁺CD25⁺ sobre a proliferação de células CD4⁺ autólogas frente a estímulos inespecíficos ou antígeno-específico, realizamos coculturas de células CD4⁺CD25⁻ com diferentes proporções de células CD4⁺CD25⁺ autólogas e as estimulamos com Concanavalina (ConA) ou com o antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg) (figura 4.6).

Os resultados mostraram que as células CD4⁺CD25⁻ dos três grupos analisados apresentam o mesmo potencial de resposta proliferativa quando estimuladas com ConA e que na presença de células CD4⁺CD25⁺ essa proliferação foi inibida, em uma maneira dependente do número (figura 4.6A).

Em relação à proliferação de células CD4⁺CD25⁻ frente ao estímulo específico dado pelo antígeno celular de *P. brasiliensis*, pudemos observar que somente células de pacientes (doença ativa ou tratada) apresentam aumento da proliferação em resposta a esse estímulo (comprovando a especificidade do mesmo). Apesar de serem capazes de proliferar em resposta ao antígeno fúngico, as células de pacientes do grupo com a doença ativa (DA) apresentam uma resposta inferior àquela observada no grupo de pacientes tratados (figura 4.6B). Também pudemos observar que a presença de células CD4⁺CD25⁺ autólogas é capaz de inibir essa proliferação, em ambos os grupos (figura 4.6B).

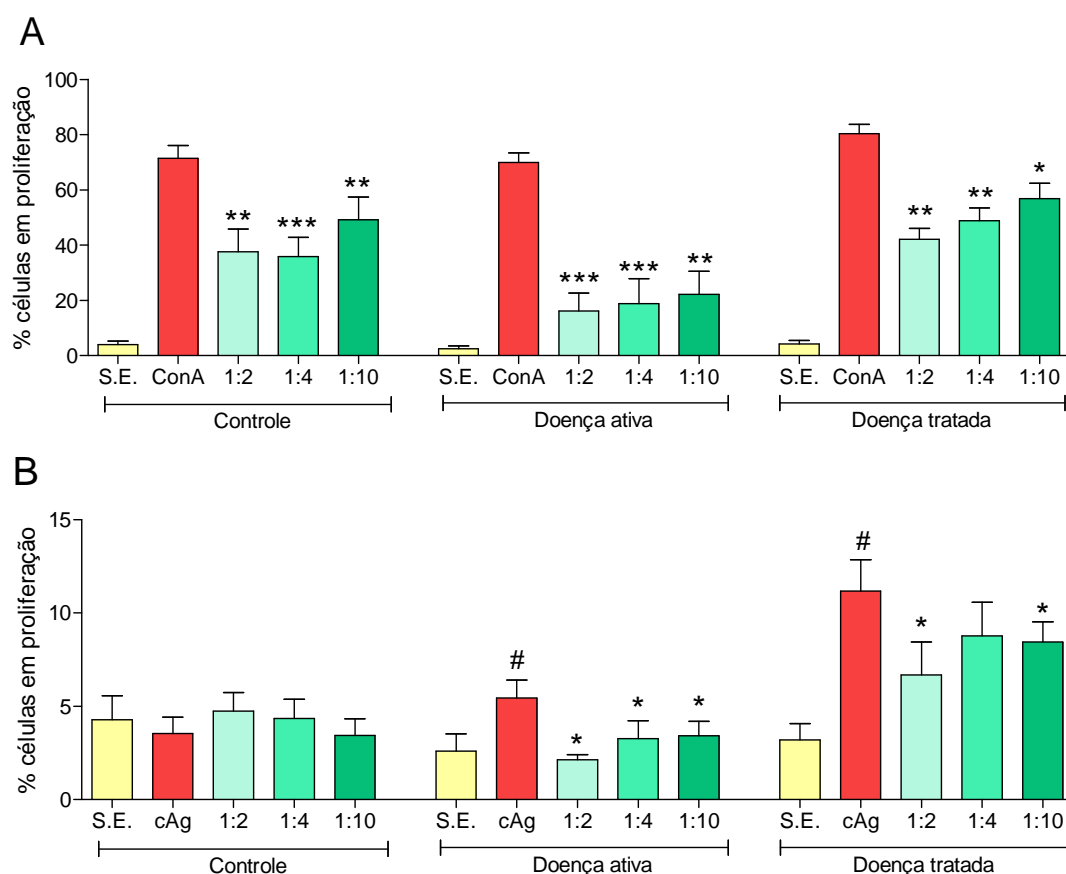


Figura 4.6 – Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4⁺CD25⁻ na presença de células CD4⁺CD25⁺ autólogas de controles normais (n=9) ou pacientes com paracoccidiodomicose ativa (n=5) ou tratada (n=6). As T CD4⁺CD25⁻ foram cultivadas sem estímulo (S.E.) ou estimuladas com concanavalina A (ConA – 5 µg/mL – **A**) ou com o antígeno celular de *P. brasiliensis* (**B**), na presença ou não de um número variável de células CD4⁺CD25⁺. Após 96 horas de cocultura as células foram coletadas e marcadas com anti-CD4. Os dados estão expressos como a porcentagem de células que sofreram proliferação dada pela queda da intensidade de fluorescência emitida pelo CFSE. Teste estatístico: ANOVA para medidas repetidas - *p≤0,05 em relação às células estimuladas com ConA (**A**) ou cAg (**B**); # *p≤0,05 em relação às células não estimuladas (S.E.- **B**).

Para comparar o efeito supressor das células CD4⁺CD25⁺ provenientes dos diferentes grupos analisados, transformamos os resultados obtidos com a porcentagem de células em proliferação em porcentagem de inibição. Para isso os valores de proliferação obtidos na presença de células CD4⁺CD25⁺ em diferentes

proporções foram divididos pelos valores de proliferação obtidos frente ao estímulo inespecífico (ConA – figura 4.7A e 4.7B) ou frente ao antígeno celular de *P. brasiliensis* (figura 4.7C), multiplicando-se o resultado final por 100.

Os resultados demonstraram que, de maneira geral, as células CD4⁺CD25⁺ provenientes de pacientes com a doença ativa (DA) apresentam atividade supressora mais intensa do que aquelas provenientes de indivíduos controle (C) e pacientes com paracoccidioidomicose tratada (DT), principalmente quando analisamos o efeito sobre a população de células T CD4⁺ das CMSP alogênicas (figura 4.7A) e células CD4⁺CD25⁺ autólogas (figura 4.7C). Embora o efeito supressor das células CD4⁺CD25⁺, provenientes dos diferentes grupos, sobre a população de células T CD4⁺ das CMSP alogênicas não ter apresentado diferenças significativas na maioria dos casos, pudemos observar uma tendência à maior atividade quando utilizamos células CD4⁺CD25⁺ provenientes de pacientes com paracoccidioidomicose ativa (DA) (figura 4.7B).

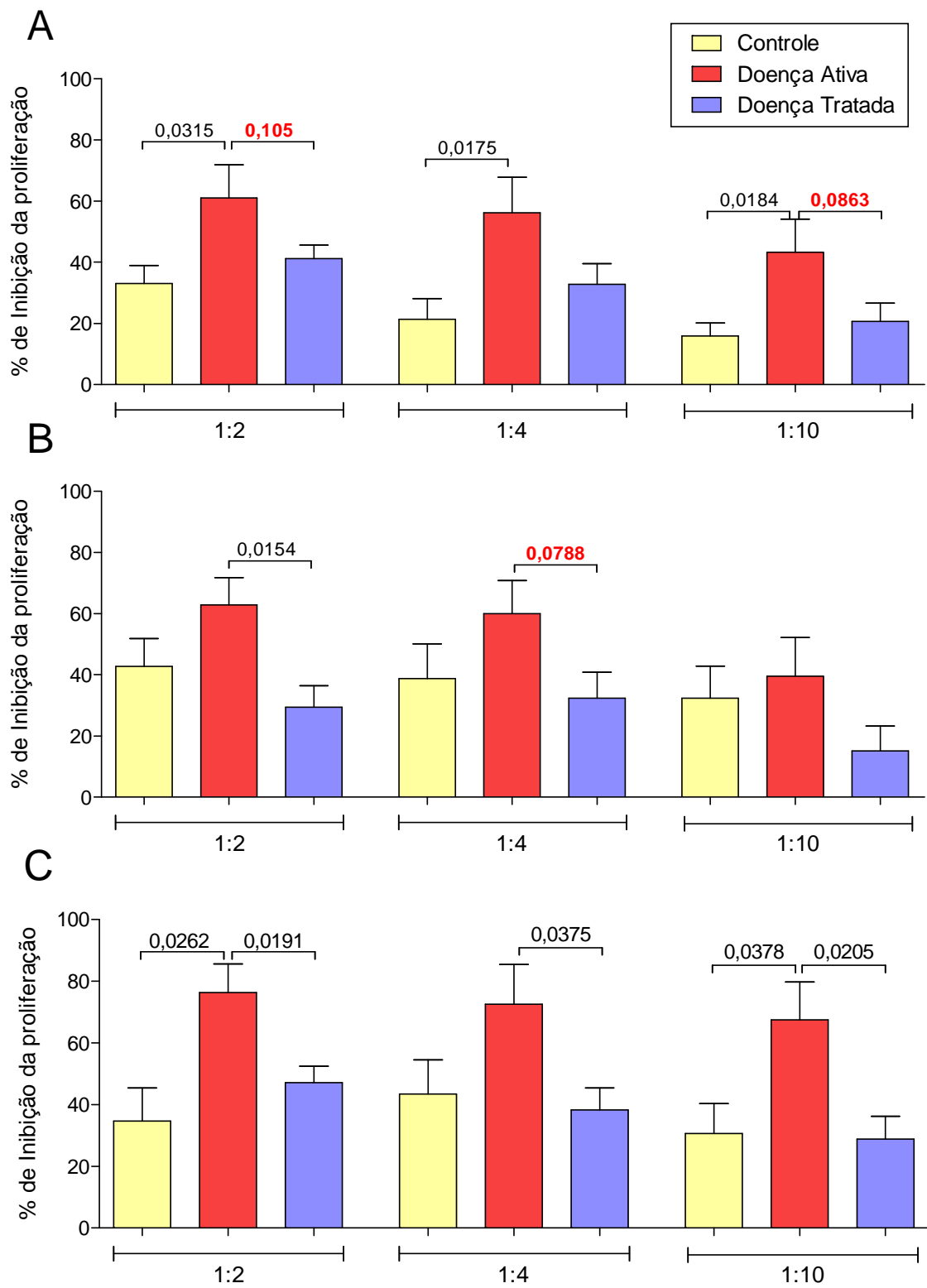


Figura 4.7 (página anterior) – Análise da porcentagem de inibição de proliferação exercida por células CD4⁺CD25⁺ (em diferentes proporções 1:2, 1:4 e 1:10) provenientes de pacientes apresentando paracoccidioidomicose ativa (n=5), tratada (n=6) ou controles normais (n=9), sobre as populações de células T CD4⁺ (A) e T CD4⁻ (B) de CMSP alogênicas ou sobre células T CD4⁺CD25⁻ autólogas estimuladas com ConA (C). Os dados estão expressos como a porcentagem de inibição da proliferação. Para isso os valores de proliferação obtidos na presença de células CD4⁺CD25⁺ em diferentes proporções foram divididos pelos valores de proliferação obtidos frente ao estímulo inespecífico (ConA – A e B) ou frente ao antígeno celular de *P. brasiliensis* (C), multiplicando-se por 100. Teste estatístico: ANOVA com pós teste de Bonferroni, os valores de *p* estão destacados nos gráficos.

4.5. Avaliação da necessidade de contato intercelular para a atividade supressora de células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes com paracoccidioidomicose (sistema “transwell”).

Para avaliarmos se o mecanismo utilizado pelas células T CD4⁺CD25⁺ para exercer suas funções supressoras é dependente de contato foram realizados experimentos nas mesmas condições descritas para a cultura convencional, separando-se fisicamente as CMSP das células T CD4⁺CD25⁻ ou T CD4⁺CD25⁺ através de um sistema “transwell” (membrana de 0,4 µm). A proliferação das células T CD4⁺ (figura 4.8) ou T CD4⁻ (figura 4.9) de CMSP em coculturas utilizando o sistema “transwell” foi então comparada com a proliferação observada em coculturas nas quais as células foram mantidas em contato (sistema convencional). Pudemos observar que quando separadas fisicamente, as células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de controles normais (figura 4.8A e 4.9A) e pacientes

com paracoccidioidomicose tratada (figura 4.8C e 4.9C) não são capazes de inibir a proliferação de células T CD4⁺ (figura 4.8) ou CD4⁻ (figura 4.9), após o estímulo com o mitógeno. Em relação às células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de indivíduos com paracoccidioidomicose ativa a separação reverteu apenas parcialmente, e nas menores proporções, a supressão observada nas coculturas convencionais, e somente quando analisamos a população de células T CD4⁺ das CMSP (figura 4.8B). Em relação às células T CD4⁻ a separação pelo sistema “transwell” reverteu completamente a atividade supressora das células CD4⁺CD25⁺ dos pacientes com paracoccidioidomicose ativa (figura 4.9B). Pudemos observar também que a separação física das CMSP e células T CD4⁺CD25⁺ provenientes dos todos os grupos analisados não teve nenhum tipo de efeito sobre a proliferação das células alogênicas.

Esses dados indicam que embora as células T CD4⁺CD25⁺ de todos os grupos analisados sejam capazes de inibir a proliferação de CMSP alogênicas, os mecanismos utilizados pelas células de pacientes com a doença ativa é, ao menos em parte, diferente dos mecanismos utilizados pelas células T CD4⁺CD25⁺ de controles ou indivíduos com a doença tratada.

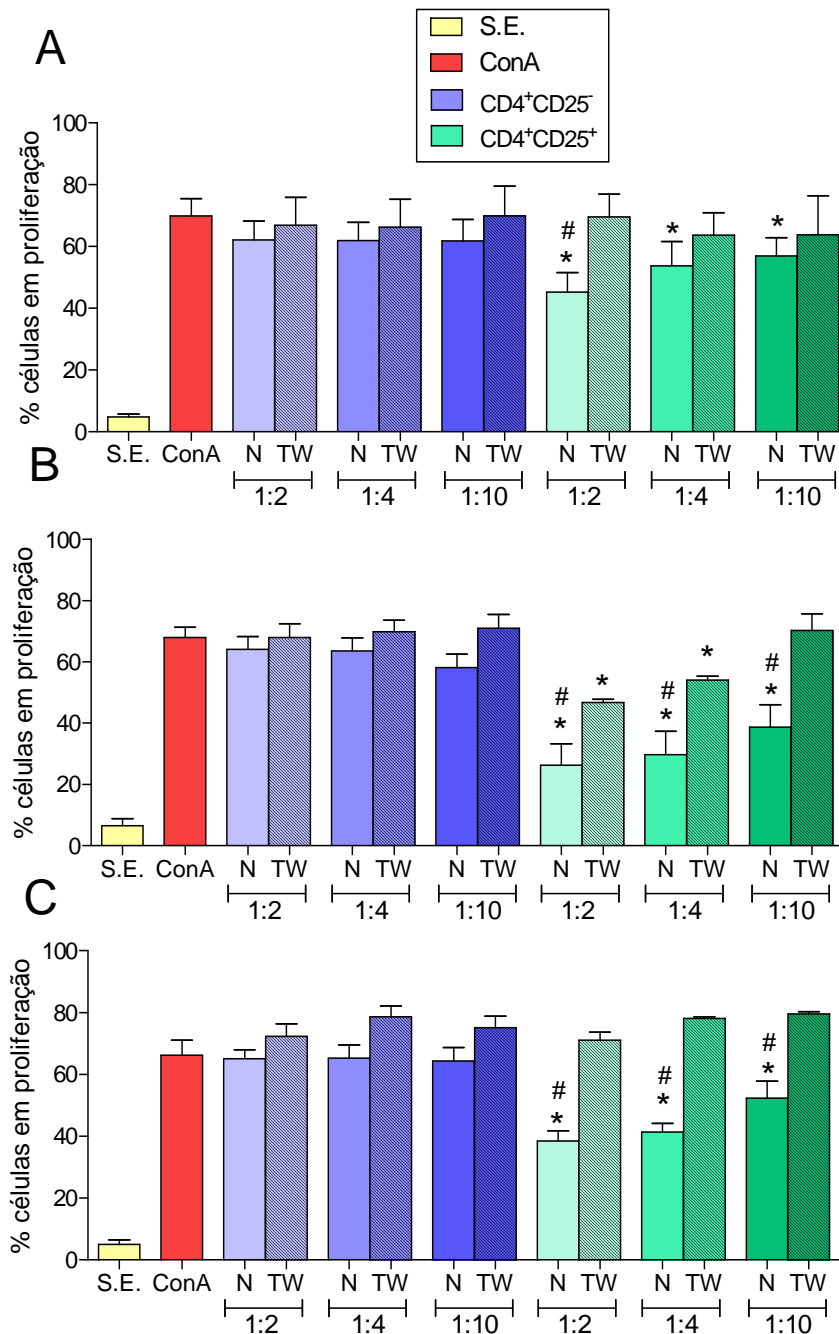


Figura 4.8 – Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4⁺ de CMSP alogênicas não estimuladas (S.E.) ou estimuladas com concanavalina A (ConA) e cocultivadas com diferentes quantidades de células T CD4⁺CD25⁺ (1:2; 1:4 e 1:10) provenientes de indivíduos controle (**A** – n=9), e de pacientes com paracoccidioidomicose ativa (**B** – n=5) ou tratada (**C** – n=6), em condições convencionais (N) ou utilizando um sistema “transwell” (TW). Os dados foram analisados como descrito em materiais e métodos. Teste estatístico: Teste *t* pareado - **p* ≤ 0,05 em relação às células estimuladas com ConA; # *p* ≤ 0,05 em relação às coculturas no sistema “transwell”.

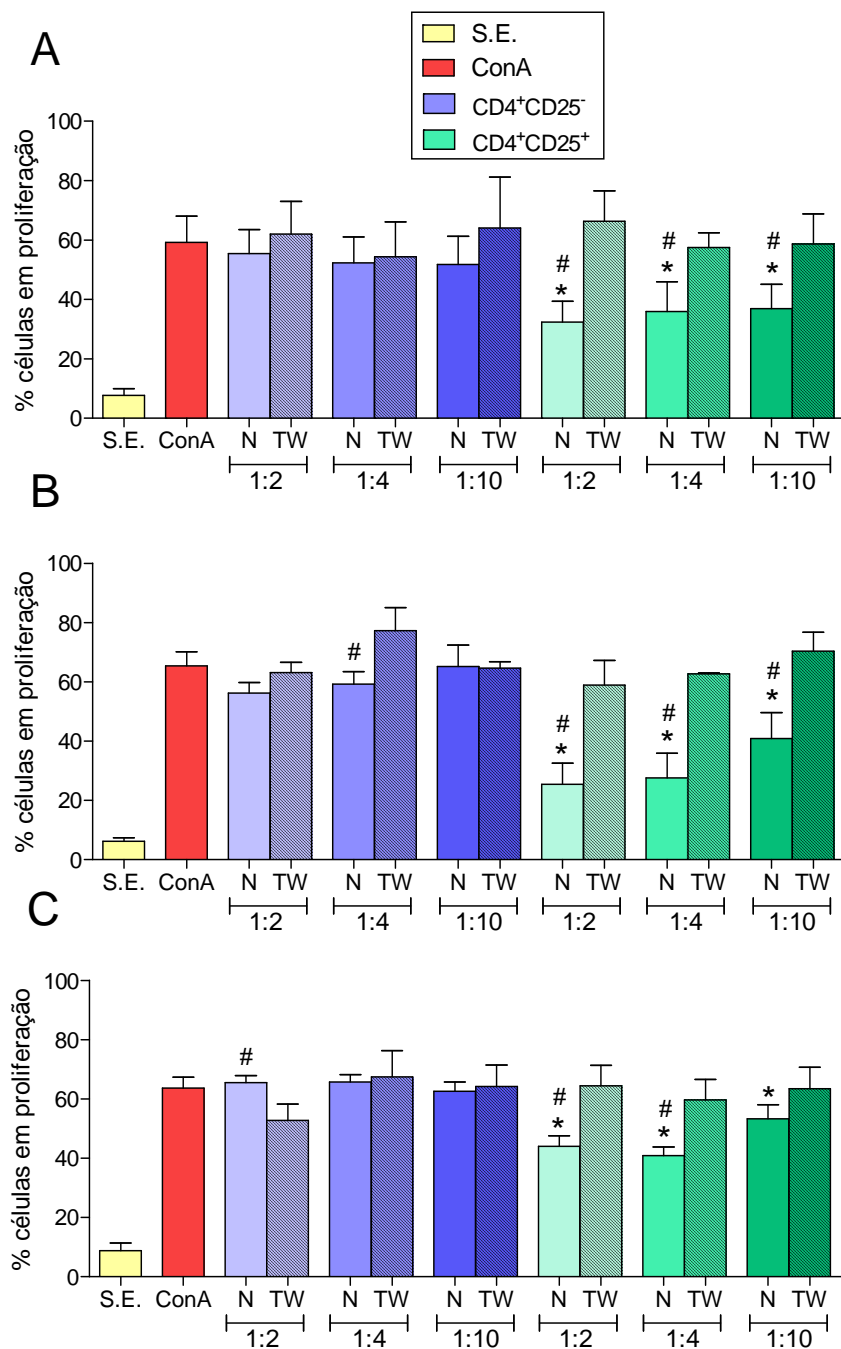


Figura 4.9 – Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4⁺ de CMSP alogênicas não estimuladas (S.E.) ou estimuladas com concanavalina A (ConA) e cocultivadas com diferentes quantidade de células T CD4⁺CD25⁺ (1:2; 1:4 e 1:10) provenientes de indivíduos controle (**A** – n=9), e de pacientes com paracoccidioidomicose ativa (**B** – n=5) ou tratada (**C** – n=6), em condições convencionais (N) ou utilizando um sistema “transwell” (TW). Os dados foram analisados como descrito em materiais e métodos. Teste estatístico: Teste *t* pareado - **p* ≤ 0,05 em relação às células estimuladas com ConA; # *p* ≤ 0,05 em relação às coculturas no sistema “transwell”.

Em relação à atividade supressora de células $CD4^+CD25^+$ sobre células $CD4^+CD25^-$ autólogas estimuladas com o mitógeno ConA, os dados demonstraram que assim como para com as CMSP alogênicas, a utilização do sistema “transwell” não propiciou a inibição da proliferação com a utilização de células provenientes de controles normais (figura 4.10A) e pacientes com paracoccidiodomicose tratada (figura 4.10C). Já a supressão observada em células de pacientes apresentando a doença ativa mostrou apenas reversão parcial da supressão (figura 4.10B).

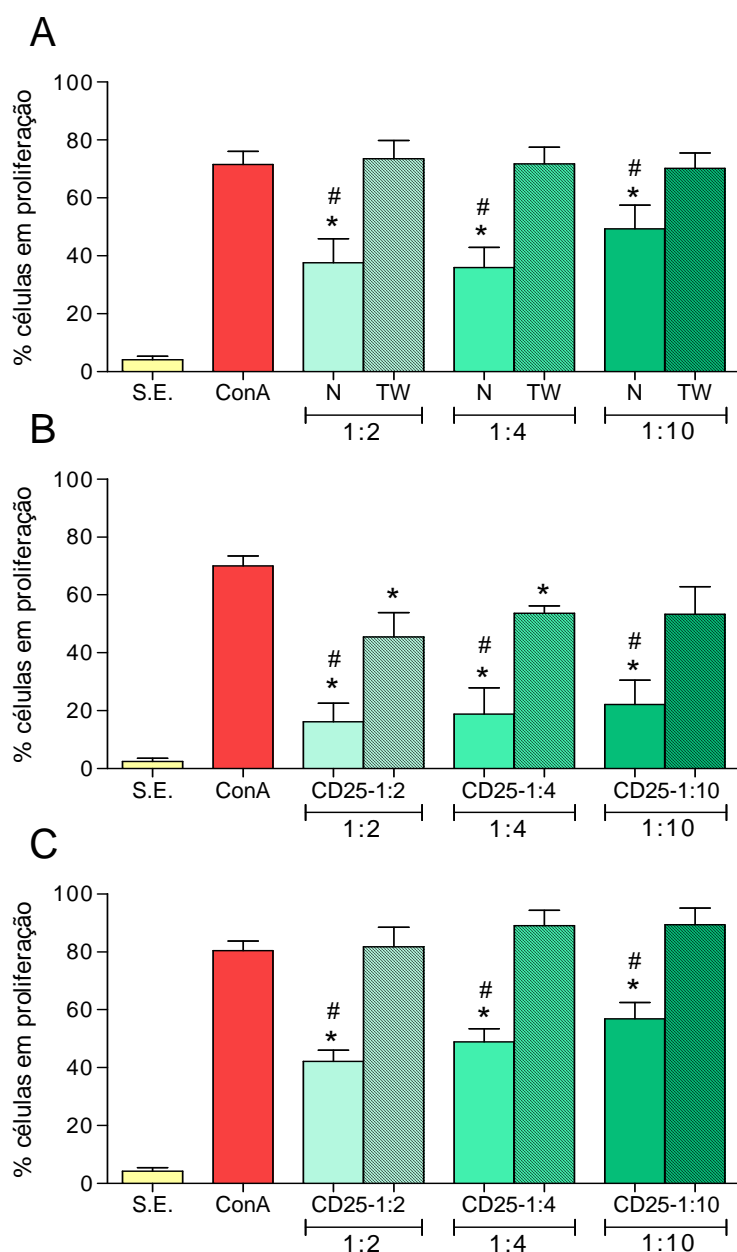


Figura 4.10 (página anterior) – Análise da resposta proliferativa da população de células T CD4⁺ de CMSP alogênicas não estimuladas (S.E.) ou estimuladas com concanavalina A (ConA) e cocultivadas com diferentes quantidade de células T CD4⁺CD25⁺ (1:2; 1:4 e 1:10) provenientes de indivíduos controle (**A** – n=9), e de pacientes com paracoccidiodomicose ativa (**B** – n=5) ou tratada (**C** – n=6), em condições convencionais (N) ou utilizando um sistema “transwell” (TW). Os dados foram analisados como descrito em materiais e métodos. Teste estatístico: Teste *t* pareado - **p* ≤ 0,05 em relação às células estimuladas com ConA; # *p* ≤ 0,05 em relação às coculturas no sistema “transwell”.

4.6. Avaliação do papel da produção de citocinas (IL-10 e TGF-β) e do consumo de IL-2 na atividade supressora de células T CD4⁺CD25⁺

Como demonstrado no item anterior a atividade supressora de células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa é apenas parcialmente dependente de contato intercelular. Dessa maneira decidimos verificar se essa atividade é exercida por meio da produção de fatores solúveis, como as citocinas supressoras IL-10 e TGF-β. Para isso, realizamos uma série de experimentos utilizando o sistema de cocultura descrito anteriormente, com a adição de anticorpos neutralizantes (anti-IL-10 e anti-TGF-β). Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.11) a cocultura de células T CD4⁺CD25⁺ de controles normais e pacientes com CMSP alogênicas (razão 1:2) inibiu aproximadamente em 50% e 75% respectivamente a proliferação das CMSP. Como descrito acima, a separação das células no sistema “transwell” reverteu totalmente a inibição no caso do grupo controle, mas apenas parcialmente quando foram utilizadas células de pacientes com a doença ativa. Como esperávamos a adição dos anticorpos neutralizantes no sistema “transwell” na presença de células T CD4⁺CD25⁺ de controles normais não teve efeito aditivo na reversão da inibição

da proliferação (figura 4.11 – lado esquerdo). Por outro lado, a adição dos anticorpos (isolados ou combinados) juntamente com as células T CD4⁺CD25⁺ de indivíduos com a doença ativa, teve efeito aditivo com o sistema transwell, demonstrando que a produção dessas duas citocinas pode ser importante para a atividade supressora dessas células nesse grupo de indivíduos (figura 4.11 – lado direito).

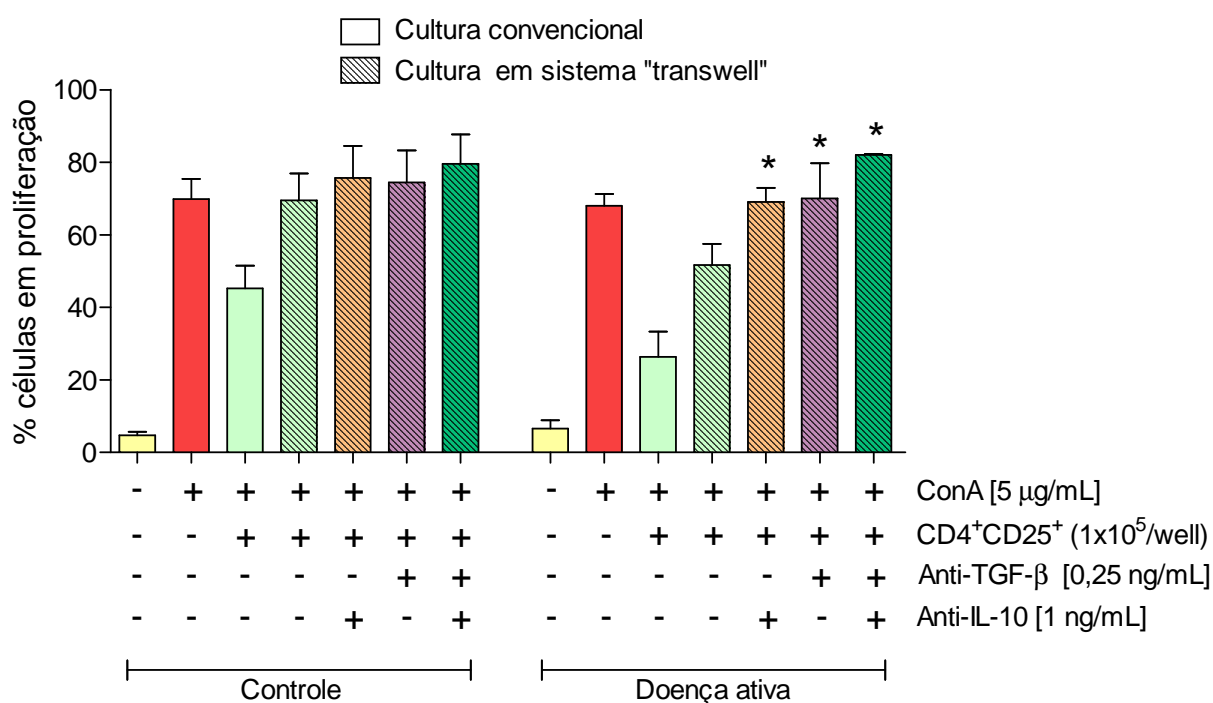


Figura 4.11 – Análise da resposta proliferativa de CMSP alogênicas não estimuladas ou estimuladas com ConA na presença de células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de indivíduos saudáveis (controle – n=5) ou pacientes com paracoccidiodomicose ativa (n=5) em cultura convencional ou no sistema “transwell” na presença de anticorpos neutralizantes (anti-IL-10 e anti-TGF-β, sozinhos ou combinados). As condições utilizadas estão representadas na figura (+ indica a presença e – a ausência do estímulo). Teste estatístico: Teste *t* pareado - * *p* ≤ 0,05 em relação às células relação às CMSP cocultivadas na presença de células T CD4⁺CD25⁺ no sistema “transwell”.

Para confirmar os resultados descritos acima a respeito do papel da produção de citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β) e do possível consumo de fatores de crescimento (IL-2) na atividade supressora exercida pelas células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a doença ativa, foram realizados outra série de experimentos somente com esse grupo de indivíduos. Na figura abaixo (figura 4.12) é possível observar que, nas culturas de CMSP estimuladas com ConA na ausência de células T CD4⁺CD25⁺, a IL-10 (sozinha ou combinada com o TGF- β) teve efeito supressor similar aquele observado nas coculturas com as células T CD4⁺CD25⁺. A adição de TGF- β sozinho teve efeito similar, mas um pouco menor aquele observado com o tratamento com a IL-10. Quando adicionamos os anticorpos neutralizantes (anti-IL-10 e anti-TGF- β , sozinhos ou combinados) nas coculturas de CMSP e células T CD4⁺CD25⁺ pudemos observar uma reversão total da supressão exercida pelas células regulatórias (figura 4.12).

Um dos possíveis meios de atuação de células regulatórias naturais é o consumo de IL-2, citocina necessária para a sobrevivência e desenvolvimento das células CD4⁺. Por esse motivo decidimos também investigar se a adição de IL-2 recombinante ou o bloqueio da IL-2 poderiam resultar em modificação da taxa de proliferação das células CD4⁺ das culturas de CMSP. Observamos que a adição de IL-2 recombinante resultou em acentuado aumento na taxa de proliferação mesmo na presença das células CD4⁺CD25⁺ indicando que o consumo da IL-2 do meio pode contribuir para a diminuição da proliferação das células CD4⁺.

A adição do anticorpo anti-IL-2 neutralizante nas culturas de CMSP estimuladas com ConA, embora tenha diminuído significativamente a capacidade proliferativa, o fez de maneira muito menos conspícua do que aquela observada na presença de citocinas supressoras. A adição de células CD4⁺CD25⁺ tratadas previamente com anticorpo bloqueador anti-CD25 teve efeito variável dependendo do paciente analisado, o que não possibilitou observarmos diferenças estatisticamente significantes (figura 4.12).

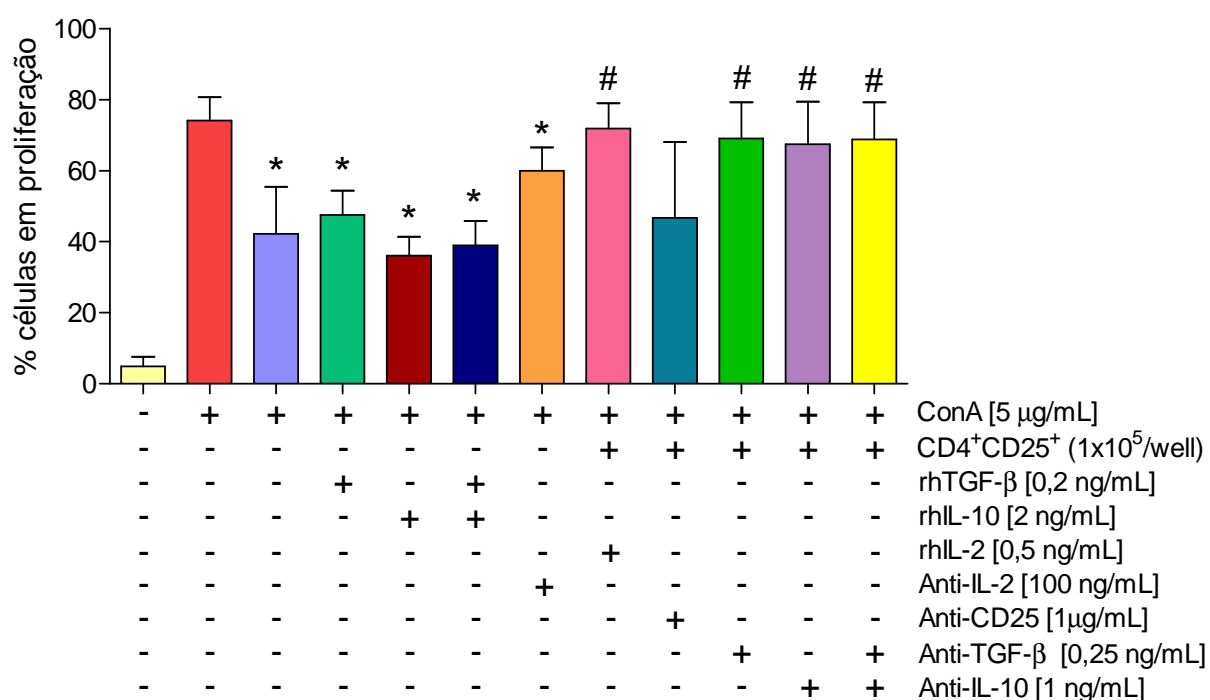


Figura 4.12 – Análise da resposta proliferativa de CMSP alogênicas não estimuladas (SE) ou estimuladas com ConA na presença de células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (n=5), citocinas recombinantes (IL-10 e TGF-β, sozinhas ou combinadas e IL-2) e anticorpos neutralizantes (anti-IL-10 e anti-TGF-β, sozinhas ou combinados e anti-IL-2 ou anti-CD25). As condições utilizadas estão representadas na figura (+ indica a presença e – a ausência do estímulo). Teste estatístico: Teste *t* pareado - * *p* ≤ 0,05 em relação às células estimuladas com ConA; # *p* ≤ 0,05 em relação às CMSP co-cultivadas na presença de células T CD4⁺CD25⁺.

4.7. Avaliação da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-10 e TGF- β em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose ativa e controles normais.

Como os experimentos mostrados no item anterior indicam que as células regulatórias de pacientes com paracoccidiodomicose ativa possivelmente exercem (ao menos parcialmente) seus efeitos supressores por meio da produção de citocinas supressoras, decidimos verificar o nível de expressão do RNA mensageiro para essas citocinas nas CMSP de pacientes e controles normais. Para esse fim, realizamos a quantificação relativa do RNA mensageiro para IL-10 e TGF- β por meio da metodologia de PCR em tempo real (Q-RT-PCR). Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.13) os níveis de expressão do RNA mensageiro para IL-10 são pelo menos 3 vezes maiores nos pacientes com a doença ativa (DA) do que os níveis encontrados em pacientes após o tratamento (DT) nos controles normais (C) (figura 4.13A). Em relação à expressão do RNA mensageiro para TGF- β (figura 4.13B), observamos uma expressão 50 vezes nas células de pacientes com a doença ativa em relação às células do grupo controle (C). Embora nas células de pacientes com a doença tratada o nível de expressão do RNA mensageiro para TGF- β seja menor no que nos pacientes com a doença ativa, pudemos observar que esse grupo de indivíduos ainda apresenta uma grande produção dessa citocina em relação ao grupo controle (cerca de 20 vezes) (figura 4.13B).

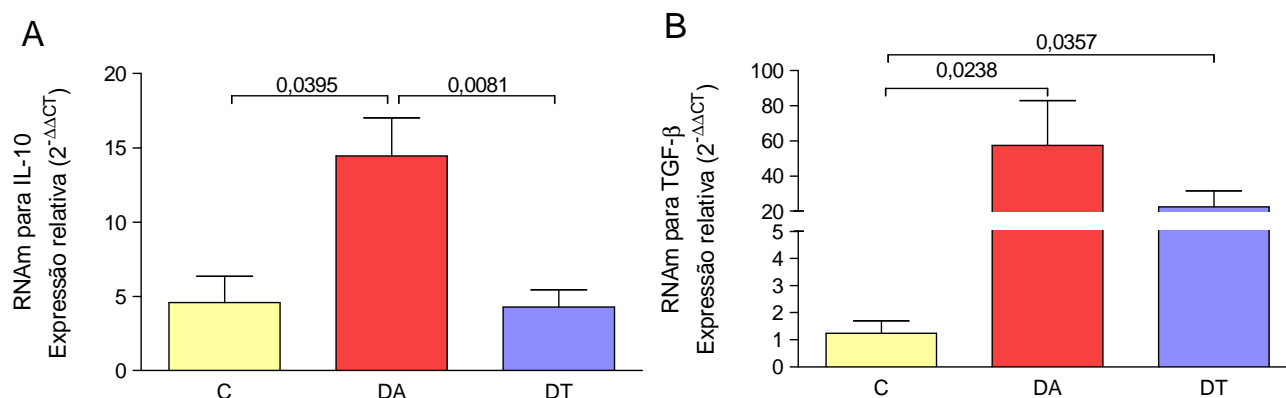


Figura 4.13 – Análise da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) do RNA mensageiro para IL-10 **(A)** e TGF-β **(B)** em células mononucleares do sangue periférico (*ex vivo*) de indivíduos controle (C – n=5) ou de pacientes com paracoccidiodomicose ativa (DA – n=6) ou tratada (DT – n=5). Os valores foram normalizados pela expressão do RNA mensageiro do gene da Ubiquitina (UBC). Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni – os valores de *p* estão destacados no gráfico.

4.8. Avaliação da produção de IL-10 e TGF-β em culturas de células

Para avaliar o efeito da presença de células T CD4⁺CD25⁺ sobre a produção de citocinas supressoras em coculturas de CMSP alogênicas e T CD4⁺CD25⁻ autólogas, realizamos experimentos para a produção de sobrenadantes. Conforme descrito em material e métodos as células CD4⁺ autólogas ou CMSP alogênicas foram cultivadas durante 48 horas (estimuladas com ConA e cAg, na presença ou ausência de células T CD4⁺CD25⁺) e após esse período o sobrenadante de cultura foi coletada para análise da produção de IL-10 e TGF-β. Conforme demonstrado no gráfico abaixo em condição sem estímulo ocorre pequena produção de IL-10 por células CMSP ou CD4⁺CD25⁻ nos três grupo estudados. Quando estimuladas pelo mitógeno Concanavalina A as CMSP (figura 4.14A) ou CD4⁺CD25⁻ (figura 4.14B) dos três grupos estudados produzem

IL-10 em grande quantidade, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos. Já o estímulo com o antígeno específico somente as células de pacientes com a doença ativa ou tratados produziram quantidades significativamente aumentadas dessa citocina, demonstrando a especificidade da resposta. A adição de células T $CD4^+CD25^+$ nas culturas estimuladas com ConA ou cAg, inibiu a produção de IL-10 pelas células de pacientes tratados ou de controles normais, mas não teve efeito significativo sobre as CMSP ou células $CD4^+CD25^-$ de pacientes com a doença ativa (figura 4.14A e 4.14B), havendo ao contrário uma tendência ao aumento da produção por células $CD4^+CD25^-$ (figura 4.14B).

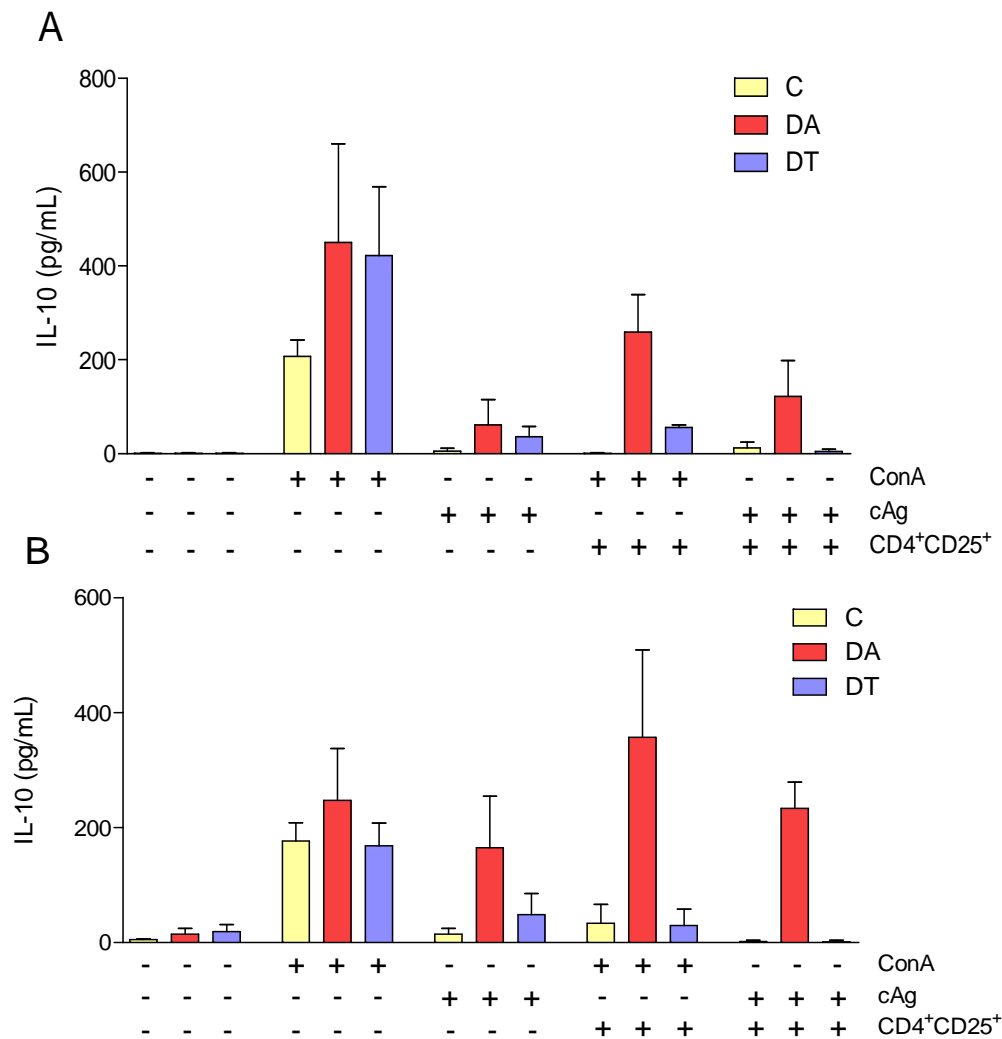


Figura 4.14 – Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de CMSP (**A**) ou células CD4⁺CD25⁻ (**B**), estimuladas por 48 horas com concanavalina A (ConA) ou antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg), na presença ou ausência de células CD4⁺CD25⁺. A dosagem de IL-10 foi realizada por meio de ELISA. As condições utilizadas estão representadas na figura (+ indica a presença e – a ausência do estímulo).

Em relação à produção de TGF- β , pudemos observar uma variação muito grande na produção dessa citocina em todas as condições testadas para as CMSP (figura 4.15A). Pudemos observar que a adição de células T CD4⁺CD25⁺

nas culturas diminui a produção dessa citocina tanto nas células estimuladas com ConA como nas células estimuladas com o antígeno cAg. Em relação às culturas de células T CD4⁺CD25⁻ (figura 4.15B), observamos que o estímulo com ConA ou cAg teve efeitos similares em todos os grupos analisados. Porém, quando adicionamos as células T CD4⁺CD25⁺ observamos a manutenção dos níveis de produção dessa citocina nos grupos de pacientes tratados ou controles normais, mas um aumento significativo no sobrenadante de células de pacientes com a doença ativa, tanto naquelas estimuladas com cAg como naquelas estimuladas com ConA (figura 4.15B).

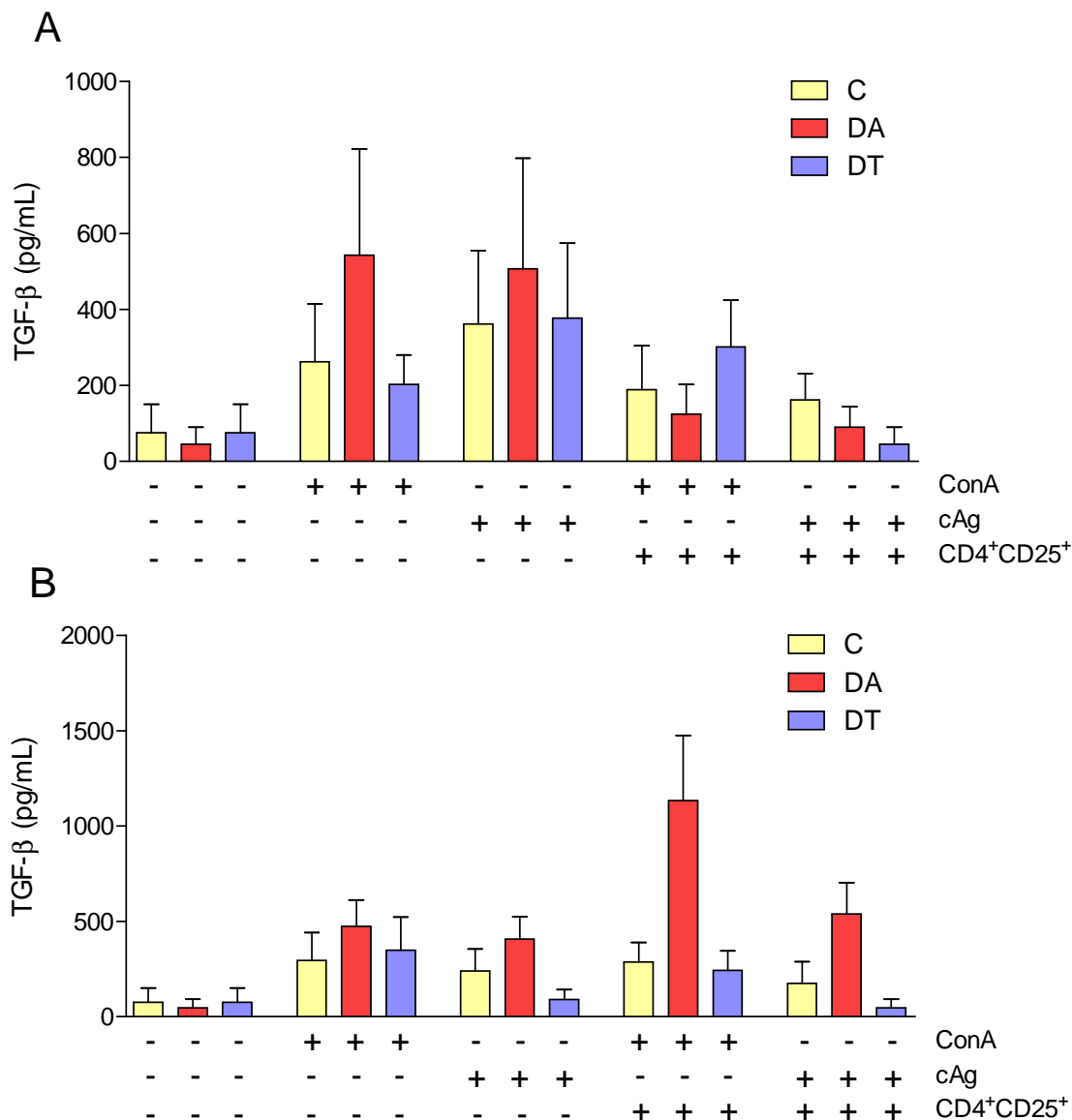
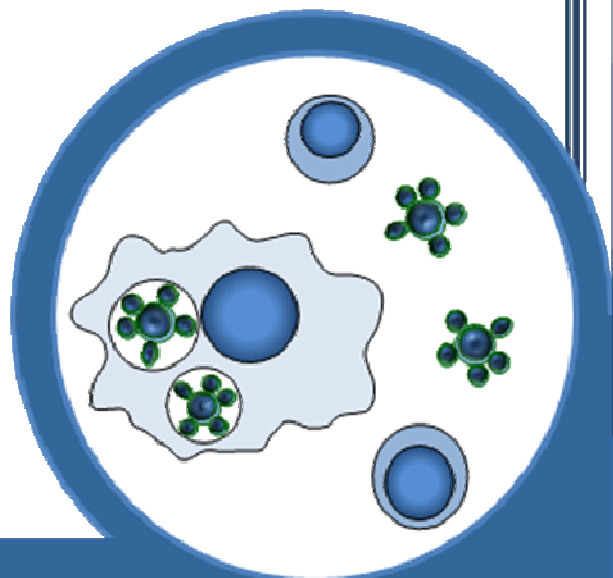


Figura 4.15 – Avaliação da produção de TGF- β em sobrenadantes de cultura de CMSP (**A**) ou células CD4⁺CD25⁻ (**B**), estimuladas por 48 horas com concanavalina A (ConA) ou antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg), na presença ou ausência de células CD4⁺CD25⁺. A dosagem de TGF- β foi realizada por meio de ELISA. As condições utilizadas estão representadas na figura (+ indica a presença e – a ausência do estímulo).

Discussão



5. DISCUSSÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior incidência nos países da América Latina, e as diferentes formas da PCM (forma adulta, forma juvenil e PCM-infecção) são caracterizadas por tipos de respostas imunológicas distintas (Mamoni *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Mamoni e Blotta, 2005; Mamoni e Blotta, 2006).

Um fator comum entre os indivíduos que desenvolvem a doença (FA e FJ) é a supressão da resposta imunológica celular, principalmente nos pacientes com as formas mais graves da doença, caracterizadas por resultados negativos em testes de hipersensibilidade do tipo tardio (THT) a antígenos do fungo e a proliferação de linfócitos diminuída (Musatti *et al.*, 1976; Restrepo *et al.*, 1978; Mota *et al.*, 1985; Benard *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1997; Benard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002), fato também observado nos modelos experimentais da paracoccidioidomicose (Jimenez-Finkel e Murphy, 1988; Singer-Vermes *et al.*, 1993). Os mecanismos envolvidos nesta imunossupressão ainda não estão totalmente descritos, mas parecem relacionar-se com o desequilíbrio no perfil de citocinas produzidas (Benard *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1997; Kashino *et al.*, 2000; Benard *et al.*, 2001; Mamoni *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Mamoni e Blotta, 2005; Mamoni e Blotta, 2006).

Após a “redescoberta” e caracterização de uma população de células T CD4⁺ com atividade regulatória ter sido indubitavelmente realizada (células T regulatórias – CD4⁺CD25⁺) (Sakaguchi *et al.*, 1982; Sakaguchi *et al.*, 1982; Sakaguchi *et al.*, 2007), muitos estudos têm sido realizados com o intuito de verificar o envolvimento dessas células na regulação da resposta imunológica a

vários agentes infecciosos (Baecher-Allan e Hafler, 2004; Netea *et al.*, 2004; Belkaid e Rouse, 2005; Campanelli *et al.*, 2006; Cavassani *et al.*, 2006; Guyot-Revol *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2007), inclusive na paracoccidioidomicose humana (Cavassani *et al.*, 2006) e experimental (Moreira *et al.*, 2008). Fenotipicamente estas células constituem populações bastante diversas, sendo a população T CD4⁺ que expressa CD25 (ou IL-2R α) e Foxp3 denominadas células T regulatórias naturais, a melhor caracterizada atualmente (Bluestone e Abbas, 2003). Além de expressar o marcador CD25, como mencionado, grande parte das células T regulatórias expressa também GITR, Fas (CD95), FasL (CD95L), CD103, CD38, CTLA-4 (CD152), LAP-1 (TGF- β de membrana) e CD62L, considerados marcadores adicionais dessa população celular (Bluestone e Abbas, 2003; Vignali *et al.*, 2008).

Nossos resultados demonstram que pacientes com paracoccidioidomicose ativa apresentam uma porcentagem maior de células T CD4⁺CD25⁺ e células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ do que aquela observada em controles normais. Além disso, pudemos observar que após a cura clínica, a porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico de pacientes se compara àquela observada em controles normais, indicando diminuição da população de células regulatórias após o tratamento que coincide com o retorno da resposta imune celular normal.

A expressão aumentada do RNAm para FoxP3 nas CMSP de pacientes com a doença ativa, também corrobora com os achados obtidos por meio da análise realizada por citometria de fluxo. O fator de transcrição FoxP3 é um dos marcadores mais utilizados para caracterizar a população de células regulatórias.

Apesar de sua expressão, principalmente em células humanas, também ser induzida em células T ativadas, a sua presença é essencial para a atividade supressora exercida pelas células T regulatórias (Hori e Sakaguchi, 2004; Kim e Rudensky, 2006; Ziegler, 2006).

Na tuberculose humana, Guyot-Revol *et al.* (2006) observaram um número aumentado de células T regulatórias na circulação periférica de pacientes com a doença ativa, em comparação a indivíduos saudáveis. Em trabalho publicado recentemente, Cavassani *et al.* (2006) analisaram esse mesmo parâmetro mas não detectaram diferenças entre a porcentagem de células regulatórias de pacientes com paracoccidioidomicose e controles normais. Esses resultados aparentemente discrepantes poderiam ser explicados devido a diferenças na abordagem experimental, e ao tempo de tratamento pelo qual os pacientes foram submetidos. Apesar de não ter encontrada diferença na porcentagem de células CD4⁺CD25⁺, Cavassani *et al.* (2006) relatam que as células de pacientes com paracoccidioidomicose apresentam uma maior expressão de marcadores relacionados à atividade das células regulatórias (CTLA-4 e GITR), fato que nossos dados confirmam. Como foi demonstrado, observamos que além de apresentarem porcentagem maior de células regulatórias, essas células em pacientes com a doença ativa, expressam maior quantidade de marcadores como o CTLA-4 (CD152), LAP-1 (TGF- β), GITR, CD95L e TLR-2.

O CTLA-4 (CD152) pode apresentar um papel importante na imunossupressão observada na paracoccidioidomicose, visto que em cultura, células mononucleares de pacientes com PCM recuperam sua capacidade proliferativa quando são adicionados ao meio de cultura anticorpos que

neutralizam o CTLA-4, sendo este bloqueio acompanhado pelo aumento da produção de IFN- γ (Campanelli *et al.*, 2003). Nossos dados demonstraram uma elevação na expressão de CTLA-4 em células CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a doença ativa, dessa forma, é possível que um dos mecanismos de supressão exercida por essas células em pacientes com paracoccidioidomicose seja mediado pelo CTLA-4. A interação do CTLA-4 com seus ligantes (CD80 e CD86) em células apresentadoras de antígeno (células dendríticas – DCs e macrófagos) induz a produção de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), notadamente pela DCs, uma potente molécula inibitória conhecida por seus efeitos na indução de metabólitos pró-apoptóticos a partir do metabolismo do triptofano, resultando na supressão de células T efectoras (Fallarino *et al.*, 2003). Além disso, a interação do CTLA-4 expresso nas células T regulatórias com as moléculas de CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno, compete com a ligação das moléculas de CD28 expressas nas células efectoras, impedindo a ativação completa das mesmas.

Também pudemos observar uma elevada expressão de CD95 e CD95L nas células regulatórias de todos os grupos analisados, sendo que o CD95L foi particularmente expresso pelas células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a doença ativa. O CD95 (Fas) e seu ligante CD95L (Fas-L) são membros da grande família de receptores do TNF, e apresentam como função principal a indução de apoptose, principalmente de células T ativadas (Ju *et al.*, 1999; Xu, G. e Shi, 2007). Na paracoccidioidomicose humana, Campanelli *et al.* (2003) demonstraram o papel da interação CD95-CD95L, que leva a apoptose de linfócitos ativados e

cujo bloqueio resulta na redução significativa da taxa de apoptose de células *in vitro*.

Além da expressão aumentada de CTLA-4 e CD95L, pacientes com paracoccidioidomicose ativa apresentaram aumento no número de células T CD4⁺CD25⁺GITR⁺. O GITR é expresso constitutivamente em células T CD4⁺CD25⁺ e induzido transitoriamente após a ativação em células T CD4⁺CD25⁻. A interação do GITR com o seu ligante (GITRL), expresso em células apresentadoras de antígeno, leva a expansão dos linfócitos das duas populações após a sinalização via TCR (Shevach e Stephens, 2006). Dessa forma o aumento da expressão do GITR em células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes com a forma ativa da paracoccidioidomicose pode contribuir para o aumento de seu número na circulação. Na infecção experimental por *Candida albicans* foi demonstrado que a ausência (uso de camundongos nocaute) de GITR leva a um aumento na sobrevivência dos camundongos devido ao aumento na produção de citocinas do tipo Th1 que levam a um melhor controle da infecção (Agostini *et al.*, 2005). Além de mediar a expansão e auxiliar na sobrevivência de células efectoras e células T regulatórias, o GITR também apresenta outras funções. Em um trabalho recente foi demonstrado que a interação do GITR expresso por células T regulatórias e o GITRL expresso em linfócitos B, induz nesse último grupo de células a produção de imunoglobulinas, particularmente de IgG4 (Satoguina *et al.*, 2008). Como mencionado anteriormente, pacientes com as formas mais graves da paracoccidioidomicose caracteristicamente produzem grandes quantidades de IgG4, cujos níveis diminuem após o tratamento efetivo (Mamoni *et al.*, 2002).

Recentemente Suttmüller *et al.* (2006) demonstraram que o receptor do tipo Toll-2 (TLR-2) apresenta um papel de grande importância na indução de expansão e no controle das funções de células T regulatórias. Na infecção experimental por *Candida albicans*, foi demonstrado que a ausência do TLR-2 (nocaute) induz resistência à infecção pelo fungo, e que essa resistência pode ser associada à diminuição do número de células T regulatórias naturais e consequentemente da produção de IL-10 (Netea *et al.*, 2004). Observamos em nossos resultados que células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes com PCM ativa apresentam uma maior expressão de TLR-2 do que pacientes tratados (embora a expressão em células do grupo controle seja semelhante), dessa forma, uma maior expressão desse receptor nas células de pacientes com a doença ativa, pode estar associado à expansão desse tipo celular nesse grupo de pacientes, talvez contribuindo para o aumento do número de células regulatórias nesse grupo de indivíduos.

Além da análise da população CD4⁺CD25⁺ decidimos também analisar a população CD4⁺CD25⁻ a fim de excluir a possibilidade de que a baixa resposta proliferativa observada nesses linfócitos fosse causada por alterações no fenótipo dessas células. Encontramos diferenças significativas apenas na expressão de GITR, CTLA-4 e CD95L entre as células CD4⁺CD25⁻ de pacientes e controles. Embora a diferença de expressão seja significativa, a expressão dessas moléculas é extremamente baixa nessas células em comparação à expressão das mesmas moléculas em células CD4⁺CD25⁺. O aumento de GITR em células CD4⁺CD25⁻ de pacientes com a paracoccidioidomicose ativa pode indicar um estado de ativação aumentado nos linfócitos desses pacientes, provocado pela doença em atividade, já que como mencionado, a expressão de GITR é induzida transitoriamente

durante a ativação dos linfócitos T efetores (Shevach e Stephens, 2006). Já o aumento de CD95L e CTLA4 nesse grupo de pacientes pode indicar um aumento da taxa de apoptose, já descrita anteriormente (Campanelli *et al.*, 2003).

Apesar de não havermos encontrado diferenças significativas quanto à expressão de CD103 e CCR5 nas células T CD4⁺CD25⁺ nos grupos analisados, pudemos observar que essas moléculas são expressas predominantemente pelas células regulatórias. O CD103 é uma integrina, associada à migração de células para o trato gastro-intestinal e expresso por células T regulatórias (Allakhverdi *et al.*, 2006). Já o CCR5 é um receptor de quimiocina, cujos ligantes são o CCL3, CCL4 e CCL5, quimiocinas inflamatórias.

Na infecção experimental por *Leishmania major* a utilização de camundongos deficientes para CCR5 aumenta a resistência à doença, diminuindo a carga parasitária e aumentando o número de células produtoras de IFN- γ , sendo esses resultados associados à diminuição do número de células regulatórias (Yurchenko *et al.*, 2006). Em um estudo similar, aplicado na paracoccidiodomicose experimental e realizado recentemente, Moreira *et al.* (2008) demonstraram que a infecção de camundongos nocaute para CCR5 resulta em uma menor carga fúngica, com diminuição do infiltrado de células T CD4⁺CD25⁺ nas lesões causadas pelo *P. brasiliensis*.

Na paracoccidiodomicose humana, Cavassani *et al.* (2006) demonstraram que as lesões de pacientes contém células com alta expressão de CCR5, também associadas à presença de células T regulatórias. A análise do infiltrado pulmonar de camundongos deficientes para IFN- γ infectados pelo *P. brasiliensis* também

demonstra um grande número de células que expressam CCR5, assim como produção aumentada de seus ligantes (CCL3 e CCL5) (Souto *et al.*, 2003). Na infecção humana a análise do lavado bronco alveolar de pacientes demonstra produção aumentada de CCL3 (Fornazim *et al.*, 2003) fato que poderia levar ao recrutamento das células expressando CCR5 (dentre elas as células regulatórias) para a lesão, dessa maneira contribuindo para a progressão da doença.

A análise funcional das células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺) provenientes de pacientes com a doença ativa, doença tratada e controles normais demonstrou que independentemente do grupo, essas células são capazes de suprimir a resposta proliferativa, tanto de CMSP alogênicas, como de células T CD4⁺CD25⁻ autólogas. A comparação da atividade supressora nos diversos grupos de indivíduos demonstrou que as células provenientes de pacientes com a doença ativa apresentam maior atividade. Esses achados estão de acordo com aqueles encontrados por Cavassani *et al.* (2006) que, embora tenham utilizado metodologia diferente para avaliar a proliferação de células (avalição da proliferação por meio da incorporação de timidina tritiada, que não permite a diferenciação do tipo de célula em proliferação), obtiveram resultados semelhantes. Nossos resultados demonstraram também que após o tratamento efetivo, as células T CD4⁺CD25⁺ apresentam atividade supressora similar àquela observada no grupo controle. Um fato interessante dos experimentos realizados com células T CD4⁺CD25⁻ autólogas é que na ausência de células T CD4⁺CD25⁺ a proliferação dessas células em resposta ao mitógeno ConA nos dois grupos é similar, o mesmo não ocorrendo antes da separação de células (dados não mostrados). Estudos realizados com o intuito de analisar a resposta proliferativa

de CMSP de pacientes com a doença ativa a outro mitógeno (fitohemaglutinina – PHA) indicam que as células desses indivíduos apresentam diminuição da capacidade de resposta, caracterizando assim a supressão da resposta imunológica celular (Musatti *et al.*, 1976; Silva *et al.*, 1995).

As células regulatórias exercem suas funções por diversos mecanismos, que podem ou não depender de contato intercelular (von Boehmer, 2005; Vignali *et al.*, 2008). A utilização do sistema “transwell” nas coculturas nos permitiu verificar que a atividade supressora de células regulatórias de pacientes e controles normais é, ao menos em parte, dependente de contato. Nossos resultados demonstraram que o efeito supressor exercido pelas células regulatórias provenientes de controles normais e pacientes tratados foi completamente revertido quando se impediu o contato entre as células regulatórias e as CMSP alogênicas ou células T CD4⁺CD25⁺ autólogas. Entretanto, para as células provenientes de pacientes com a doença ativa houve somente um efeito parcial. Esse fato indica que as células regulatórias dos grupos analisados atuam por mecanismos diferentes.

Um mecanismo de ação bastante discutido atualmente é a indução de linfócitos com caráter regulatório por células dendríticas ditas “tolerogênicas”. O caráter tolerogênico de células dendríticas tem sido evidenciada em populações como a população de células dendríticas presentes no intestino que através do ácido retinóico convertem linfócitos naive em células com habilidades regulatórias (Mucida *et al.*, 2007). Em nossos experimentos não abordamos essa questão nem verificamos se as células dendríticas estariam envolvidas na conversão de

linfócitos em células regulatórias mas, esse seria um possível explicação para o número aumentado de células regulatórias nos pacientes com a doença ativa.

A supressão mediada por contato é exercida por diferentes mecanismos que incluem a indução de apoptose mediada por CD95-CD95L, competição pela ligação com moléculas co-estimulatórias mediada pelo CTLA-4 ou por meio de sinais supressores induzidos por meio da ligação do TGF- β expresso na superfície das células regulatórias com o seu receptor nas células efectoras (von Boehmer, 2005; Vignali *et al.*, 2008). A supressão mediada pelo TGF- β , expresso na superfície das células regulatórias complexado ao peptídeo associado à latência (LAP), aparentemente é uma das principais vias utilizadas pelas células regulatórias (Nakamura *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2008). Estudos recentes indicam que a sinalização via CTLA-4 aumenta a atividade supressora exercida pelo TGF- β de superfície, aumentando a disponibilidade dessa molécula na região de contato entre as células (Oida *et al.*, 2006). Conforme demonstrado, essas moléculas apresentaram aumento de expressão nas células regulatórias de controles normais e pacientes com paracoccidioidomicose, embora a expressão seja maior neste último grupo.

Como as células regulatórias de pacientes com doença ativa mostraram exercer suas atividades por outros mecanismos além daqueles que exigem contato, decidimos analisar o papel da produção de citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β) nesse grupo, por meio de culturas suplementadas com citocinas recombinantes (IL-10 e TGF- β) ou com anticorpos neutralizantes. Na leishmaniose experimental, a população de células T CD4⁺CD25⁺ expressando GITR, CTLA-4 e

Foxp3 nas lesões de pacientes, é capaz de suprimir *in vitro* a proliferação de células T e produzir grandes quantidades de IL-10 e TGF- β (proteína e RNAm) e que após a depleção dessa população de células ocorre o aumento da produção de IFN- γ (Campanelli *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que a adição de IL-10 recombinante isoladamente ou combinada com TGF- β em culturas de CMSP estimuladas com concanavalina A teve efeitos similares àqueles observados nas culturas realizadas na presença de células T CD4⁺CD25⁺. Embora o efeito do TGF- β adicionado isoladamente não tenha exercido função supressora muito evidente, houve uma redução parcial da proliferação das CMSP. A adição de anticorpos neutralizantes (anti-IL10 e anti-TGF- β isoladamente ou combinados) em coculturas de CMSP alogênicas e células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de pacientes com a doença ativa foi capaz de inibir completamente o efeito supressor exercido pelas células regulatórias. É interessante notar que ao contrário do TGF- β recombinante, cujo efeito foi somente parcial, a adição do anticorpo neutralizante para essa citocina aboliu completamente o efeito supressor das células regulatórias. Esse fato talvez possa ser explicado pela neutralização do TGF- β solúvel, associada ao bloqueio da ligação do TGF- β expresso na superfície das células regulatórias com seu receptor na célula efetora.

Para confirmar a produção das citocinas supressoras, analisamos por meio de ELISA a presença das mesmas no sobrenadante de cultura, assim como a expressão do RNA mensageiro pelas CMSP. Nossos resultados demonstraram que as CMSP de pacientes com a doença ativa expressam grande quantidade do

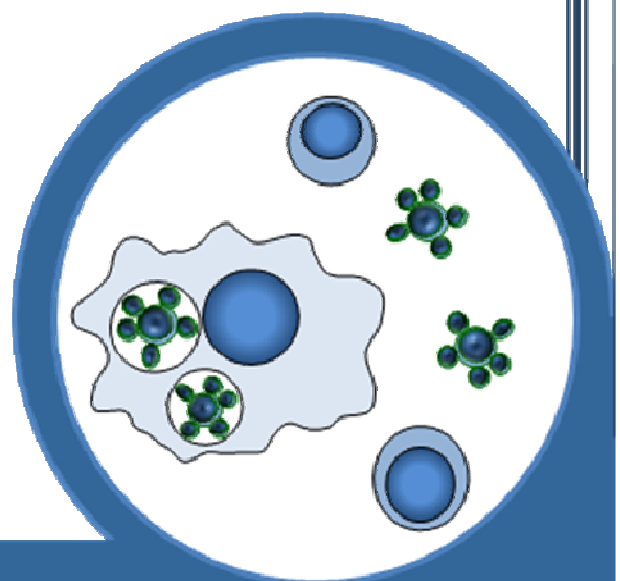
RNA_m para essas citocinas, quando comparadas às células de controles normais. Além disso, observamos que nas culturas de CMSP ou células CD4⁺CD25⁻ estimuladas com ConA ou com antígeno celular de *P. brasiliensis* houve uma grande produção de IL-10 por células de pacientes com paracoccidiodomicose (com doença ativa ou tratados), quando comparadas com as células de controles. Embora a presença de células T CD4⁺CD25⁺ tenha diminuído a produção dessa citocina nas culturas de células de pacientes tratados ou controles normais, nas culturas de pacientes com a doença ativa houve um aumento da produção (principalmente nas culturas de células CD4⁺CD25⁻). Em relação à produção de TGF-β, pudemos observar um aumento significativo, somente quando as células CD4⁺CD25⁻ foram cultivadas na presença de células CD4⁺CD25⁺.

O papel da produção de citocinas supressoras (IL-10 e TGF-β) pelas células regulatórias ainda não está bem estabelecido (Vignali *et al.*, 2008) e nossos resultados também não permitem dizer se o aumento da expressão do RNA_m e produção da proteína para essas citocinas é devido à produção por outro tipo de célula. Fica claro contudo, que a presença de células regulatórias aumenta essa produção, quer seja diretamente ou pela indução da produção por outro tipo celular.

Em conjunto nossos resultados demonstram que as células regulatórias (T CD4⁺CD25⁺) podem estar associadas à supressão da resposta imunológica celular observada nos pacientes com paracoccidiodomicose, e embora ainda sejam necessários estudos adicionais para indicar o exato mecanismo utilizado por essas células para exercer suas funções supressoras, podemos concluir que

ao menos parcialmente, esses efeitos são dependentes de contato e da modulação da produção de citocinas supressoras.

Conclusão



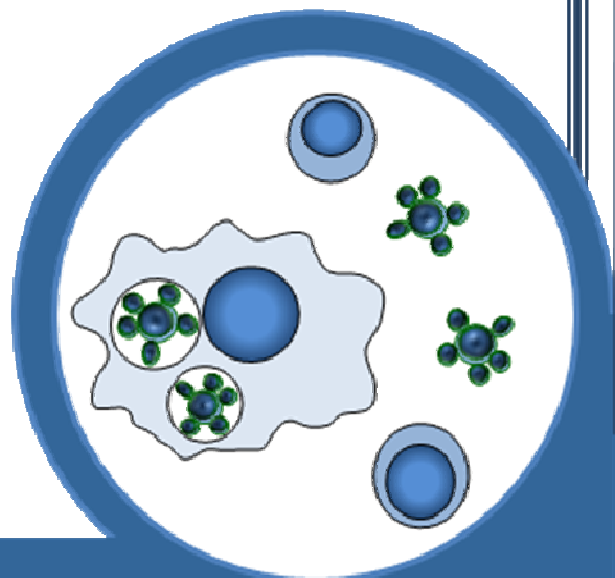
6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que os pacientes com paracoccidioidomicose ativa apresentam um número aumentado de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+$) no sangue periférico; que essas células expressam altos níveis de moléculas associadas à atividade regulatória como o CTLA-4, CD95L, GITR e TGF- β e que esse número retorna a valores normais após o tratamento antifúngico efetivo.

Também pudemos observar que as células regulatórias de pacientes com a doença ativa apresentam atividade supressora superior àquela observada em controles normais e pacientes tratados e que essa atividade é mediada por mecanismos ligeiramente diferentes nos grupos analisados. Enquanto nos indivíduos do grupo controle e pacientes com paracoccidioidomicose tratada a supressão é mediada principalmente pelo contato intercelular, no grupo de pacientes com a doença ativa, outro mecanismo deve estar associado ao efeito do contato. A análise da participação da produção de IL-10 e TGF- β , e do consumo de IL-2 por parte das células regulatórias apesar de não ser conclusivo, demonstrou que a produção dessas citocinas supressoras pode desempenhar um papel preponderante nesse mecanismo, enquanto que o consumo de IL-2 aparenta ter um efeito um pouco menos preponderante.

Em conjunto nossos resultados permitem concluir que a supressão da resposta imunológica celular observada na paracoccidioidomicose humana, pode ao menos em parte, estar relacionada à presença de um número aumentado de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+$) com atividade supressora aumentada.

Referências Bibliográficas



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini, M., Cenci, E., Pericolini, E., Nocentini, G., Bistoni, G., Vecchiarelli, A., Riccardi, C. The glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related gene modulates the response to *Candida albicans* infection. *Infect Immun*, 73:7502-8, 2005.

Allakhverdi, Z., Fitzpatrick, D., Boisvert, A., Baba, N., Bouguermouh, S., Sarfati, M., Delespesse, G. Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*, 118:1342-9, 2006.

Andersson, J., Tran, D. Q., Pesu, M., Davidson, T. S., Ramsey, H., O'Shea, J. J., Shevach, E. M. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med*, 205:1975-81, 2008.

Bach, J. F. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*, 3:189-98, 2003.

Baecher-Allan, C., Hafler, D. A. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med*, 200:273-6, 2004.

Baida, H., Biselli, P. J., Juvenale, M., Del Negro, G. M., Mendes-Giannini, M. J., Duarte, A. J., Benard, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 1:273-8, 1999.

Belkaid, Y., Rouse, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 6:353-60, 2005.

Benard, G., Hong, M. A., Del Negro, G. M., Batista, L., Shikanai-Yasuda, M. A., Duarte, A. J. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*, 54:7-12, 1996.

Benard, G., Mendes-Giannini, M. J., Juvenale, M., Miranda, E. T., Duarte, A. J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*, 175:1263-7, 1997.

Benard, G., Romano, C. C., Cacere, C. R., Juvenale, M., Mendes-Giannini, M. J., Duarte, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 13:248-52, 2001.

Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., Ochs, H. D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27:20-1, 2001.

Bluestone, J. A., Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3:253-7, 2003.

Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, 6:89-117, 1993.

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepers, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., Ramsdell, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27:68-73, 2001.

Burchell, J. T., Wikstrom, M. E., Stumbles, P. A., Sly, P. D., Turner, D. J. Attenuation of allergen-induced Airway Hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008.

Cacere, C. R., Romano, C. C., Mendes Giannini, M. J., Duarte, A. J., Benard, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol*, 105:215-22, 2002.

Campanelli, A. P., Martins, G. A., Souto, J. T., Pereira, M. S., Livonesi, M. C., Martinez, R., Silva, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis*, 187:1496-505, 2003.

Campanelli, A. P., Roselino, A. M., Cavassani, K. A., Pereira, M. S., Mortara, R. A., Brodskyn, C. I., Goncalves, H. S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., Silva, J. S. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*, 193:1313-22, 2006.

Cano, L. E., Singer-Vermes, L. M., Vaz, C. A., Russo, M., Calich, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun*, 63:1777-83, 1995.

Cavassani, K. A., Campanelli, A. P., Moreira, A. P., Vancim, J. O., Vitali, L. H., Mamede, R. C., Martinez, R., Silva, J. S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol*, 177:5811-8, 2006.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198:1875-86, 2003.

Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H., Blazar, B. R. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol*, 181:5396-404, 2008.

Costantino, C. M., Baecher-Allan, C. M., Hafler, D. A. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol*, 38:921-4, 2008.

Cottrez, F., Groux, H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation*, 77:S12-5, 2004.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., Puccetti, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4:1206-12, 2003.

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4:330-6, 2003.

Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin Immunol*, 16:73-80, 2004.

Fornazim, M. C., Balthazar, A., Quagliato, R., Jr., Mamoni, R. L., Garcia, C., Blotta, M. H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J*, 22:895-9, 2003.

Franco, M., Montenegro, M. R., Mendes, R. P., Marques, S. A., Dillon, N. L., Mota, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*, 20:129-32, 1987.

Goleva, E., Cardona, I. D., Ou, L. S., Leung, D. Y. Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. *J Allergy Clin Immunol*, 116:1094-100, 2005.

Greenwald, R. J., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515-48, 2005.

Guyot-Revol, V., Innes, J. A., Hackforth, S., Hinks, T., Lalvani, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 173:803-10, 2006.

Han, G. M., O'Neil-Andersen, N. J., Zurier, R. B., Lawrence, D. A. CD4+CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*, 253:92-101, 2008.

Hesse, M., Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prifer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Shevach, E. M., Wynn, T. A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*, 172:3157-66, 2004.

Hori, S., Sakaguchi, S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect*, 6:745-51, 2004.

Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol*, 81:331-71, 2003.

Ji, J., Masterson, J., Sun, J., Soong, L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*, 174:7147-53, 2005.

Ji, M. J., Su, C., Wang, Y., Wu, H. W., Cai, X. P., Li, G. F., Zhu, X., Wang, X. J., Zhang, Z. S., Wu, G. L. Characterization of CD4⁺ T cell responses in mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 38:327-34, 2006.

Jimenez-Finkel, B. E., Murphy, J. W. Characterization of efferent T suppressor cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis*-specific afferent T suppressor cells. *Infect Immun*, 56:744-50, 1988.

Ju, S. T., Matsui, K., Ozdemirli, M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int Rev Immunol*, 18:485-513, 1999.

Kashino, S. S., Fazioli, R. A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L. H., Vaz, C. A., Burger, E., Singer, L. M., Calich, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. *J Interferon Cytokine Res*, 20:89-97, 2000.

Keynan, Y., Card, C. M., McLaren, P. J., Dawood, M. R., Kasper, K., Fowke, K. R. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. *Clin Infect Dis*, 46:1046-52, 2008.

Kim, J. M., Rudensky, A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev*, 212:86-98, 2006.

La Cava, A. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 17:421-5, 2008.

La Cava, A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 8:83-7, 2008.

Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M. G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 129:263-76, 2002.

Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., Chen, W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 9:632-40, 2008.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-8, 2001.

Mamoni, R. L., Blotta, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, 32:20-9, 2005.

Mamoni, R. L., Blotta, M. H. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 35:207-16, 2006.

Mamoni, R. L., Nouer, S. A., Oliveira, S. J., Musatti, C. C., Rossi, C. L., Camargo, Z. P., Blotta, M. H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 40:153-9, 2002.

Mamoni, R. L., Rossi, C. L., Camargo, Z. P., Blotta, M. H. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*, 65:237-41, 2001.

McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D., Maizels, R. M. Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J Immunol*, 181:6456-66, 2008.

Moreira, A. P., Cavassani, K. A., Massafra Tristao, F. S., Campanelli, A. P., Martinez, R., Rossi, M. A., Silva, J. S. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol*, 180:3049-56, 2008.

Mota, N. G., Rezkallah-Iwasso, M. T., Peracoli, M. T., Audi, R. C., Mendes, R. P., Marcondes, J., Marques, S. A., Dillon, N. L., Franco, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79:765-72, 1985.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317:256-60, 2007.

Musatti, C. C., Rezkallah, M. T., Mendes, E., Mendes, N. F. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol*, 24:365-78, 1976.

Nakamura, K., Kitani, A., Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194:629-44, 2001.

Netea, M. G., Suttmüller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C. A., Van der Meer, J. W., van Krieken, J. H., Hartung, T., Adema, G., Kullberg, B. J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 172:3712-8, 2004.

Nguyen, V. H., Zeiser, R., Dasilva, D. L., Chang, D. S., Beilhack, A., Contag, C. H., Negrin, R. S. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood*, 109:2649-56, 2007.

Oida, T., Xu, L., Weiner, H. L., Kitani, A., Strober, W. TGF-beta-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol*, 177:2331-9, 2006.

Oliveira, S. J., Mamoni, R. L., Musatti, C. C., Papaiordanou, P. M., Blotta, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*, 4:139-44, 2002.

Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T., Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 446:685-9, 2007.

Parietti, V., Chiffot, H., Müller, S., Monneaux, F. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*, 1108:64-75, 2007.

Piccirillo, C. A. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, 43:395-401, 2008.

Piccirillo, C. A., d'Hennezel, E., Sgouroudis, E., Yurchenko, E. CD4⁽⁺⁾Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. *Curr Opin Immunol*, 20:655-62, 2008.

Restrepo, A., Restrepo, M., de Restrepo, F., Aristizabal, L. H., Moncada, L. H., Velez, H. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia*, 16:151-63, 1978.

Rezvani, K., Mielke, S., Ahmadzadeh, M., Kilical, Y., Savani, B. N., Zeilah, J., Keyvanfar, K., Montero, A., Hensel, N., Kurlander, R., Barrett, A. J. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*, 108:1291-7, 2006.

Roberts, T., Beyers, N., Aguirre, A., Walzl, G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta , and interleukin-4 mRNA levels. *J Infect Dis*, 195:870-8, 2007.

Robinson, K., Kenefeck, R., Pidgeon, E. L., Shakib, S., Patel, S., Polson, R. J., Zaitoun, A. M., Atherton, J. C. Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut*, 57:1375-85, 2008.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., Nishizuka, Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*, 156:1577-86, 1982.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., Nishizuka, Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med*, 156:1565-76, 1982.

Sakaguchi, S., Wing, K., Miyara, M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1:S116-23, 2007.

Satoguina, J. S., Adjobimey, T., Arndts, K., Hoch, J., Oldenburg, J., Layland, L. E., Hoerauf, A. Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. *Eur J Immunol*, 38:3101-13, 2008.

Shevach, E. M., Stephens, G. L. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*, 6:613-8, 2006.

Silva, C. L., Silva, M. F., Faccioli, L. H., Pietro, R. C., Cortez, S. A., Foss, N. T. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*, 101:314-20, 1995.

Singer-Vermes, L. M., Caldeira, C. B., Burger, E., Calich, L. G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*, 94:75-9, 1993.

Souto, J. T., Aliberti, J. C., Campanelli, A. P., Livonesi, M. C., Maffei, C. M., Ferreira, B. R., Travassos, L. R., Martinez, R., Rossi, M. A., Silva, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol*, 163:583-90, 2003.

Sutmoller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., Adema, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 116:485-94, 2006.

Tang, Q., Boden, E. K., Henriksen, K. J., Bour-Jordan, H., Bi, M., Bluestone, J. A. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34:2996-3005, 2004.

Terme, M., Chaput, N., Combadiere, B., Ma, A., Ohteki, T., Zitvogel, L. Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol*, 180:4679-86, 2008.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I., Tone, M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*, 9:194-202, 2008.

Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T., Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., Watanabe, M. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene⁺ regulatory T cells. *J Immunol*, 171:708-16, 2003.

Vignali, D. A., Collison, L. W., Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8:523-32, 2008.

von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 6:338-44, 2005.

Waid, D. M., Vaitaitis, G. M., Pennock, N. D., Wagner, D. H., Jr. Disruption of the homeostatic balance between autoaggressive (CD4⁺CD40⁺) and regulatory (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) T cells promotes diabetes. *J Leukoc Biol*, 84:431-9, 2008.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 322:271-5, 2008.

Wohlfert, E., Belkaid, Y. Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol*, 28:707-15, 2008.

Xu, D., Liu, H., Komai-Koma, M., Campbell, C., McSharry, C., Alexander, J., Liew, F. Y. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and colitis in mice. *J Immunol*, 170:394-9, 2003.

Xu, G., Shi, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*, 17:759-71, 2007.

Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., Sakaguchi, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16:1643-56, 2004.

Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E. M., Belkaid, Y., Piccirillo, C. A. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med*, 203:2451-60, 2006.

Ziegler, S. F. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 24:209-26, 2006.

8. ANEXOS

8.1. Padronização das reações de PCR em tempo real

Os resultados da padronização do Q-RT-PCR para os RNAm testados estão demonstrados nas figuras abaixo, onde é possível observar a eficiência da reação de amplificação (figura 8.1), a correlação das eficiências (figura 8.2) e a curva de "melting" das reações (figura 8.3), nas quais foram utilizadas os "primers" para Ubiquitina (UBC), FoxP3, IL-10 e TGF- β , e que permitiram a utilização do método de $\Delta\Delta CT$ para a análise dos resultados conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001).

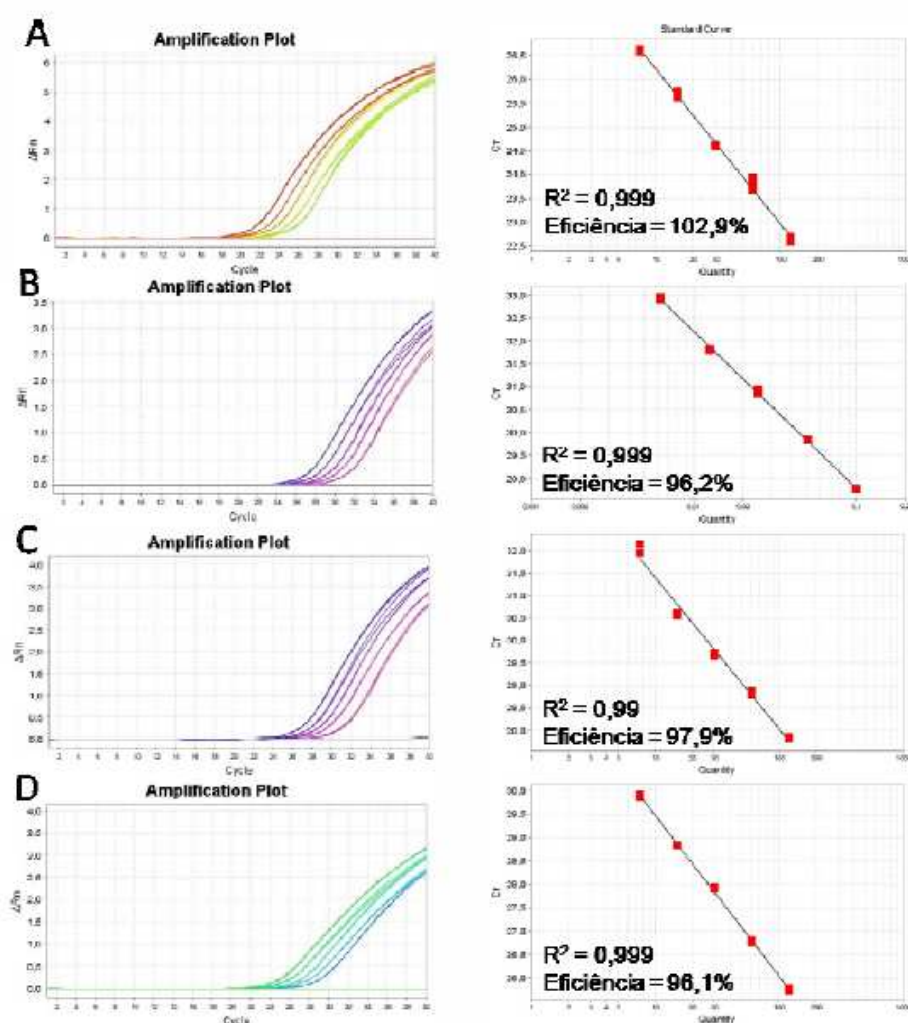


Figura 8.1 (página anterior): Gráficos de amplificação (esquerda) e curva padrão (direita) resultados da padronização da eficiência das reações de Q-RT-PCR para quantificação do RNAm para UBC (A), FoxP3 (B), IL-10 (C) e TGF- β (D). Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA diluídas na proporção de 1:10 e a seguir de forma seriada na proporção de 1:2 (5 pontos). Os gráficos demonstram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), por meio do qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos CTs em função da diluição da amostra (direita). Os valores de R^2 e da eficiência da reação estão destacados em cada gráfico. Para uso no cálculo de $\Delta\Delta CT$ os valores de R^2 devem ser maiores do que 0,9 e a eficiência da reação deve estar entre 90 e 110%.

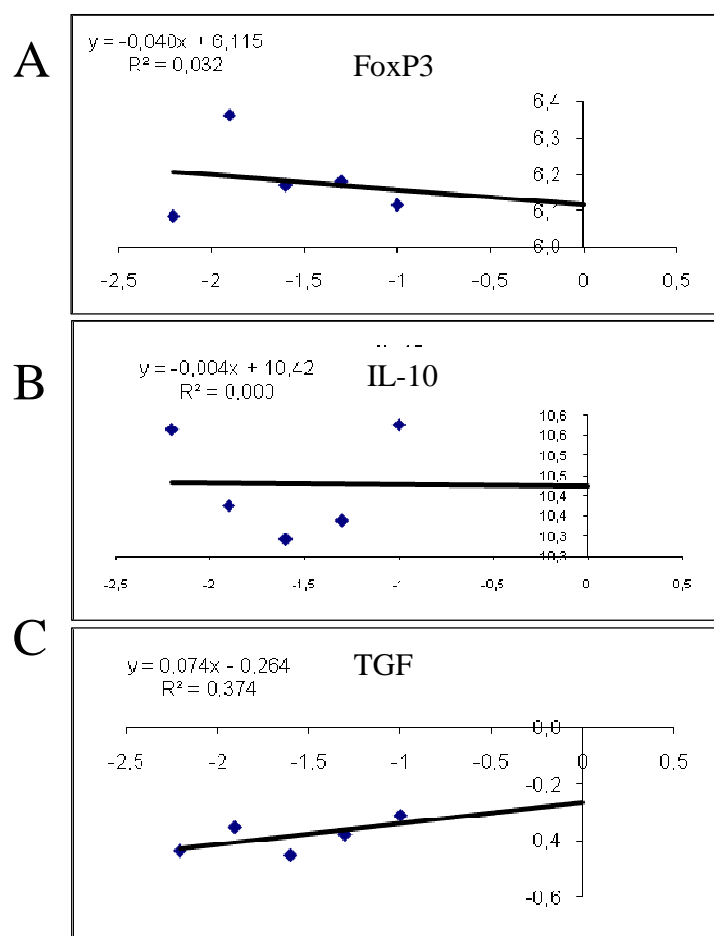


Figura 8.2: Correlação entre as eficiências do gene endógeno usado para normalização das reações de Q-RT-PCR (UBC) e os genes de interesse: FoxP3 (A), IL-10 (B) e TGF- β (C). Os gráficos representam os valores de ΔCT (média do CT do gene de interesse, menos o CT do gene endógeno), pelo logaritmo da concentração das amostras. Para poder ser utilizado o cálculo de $\Delta\Delta CT$ na quantificação das amostras, os valores de a (primeiro termo) na equação que descreve a reta deve estar entre 0,1 e -0,1.

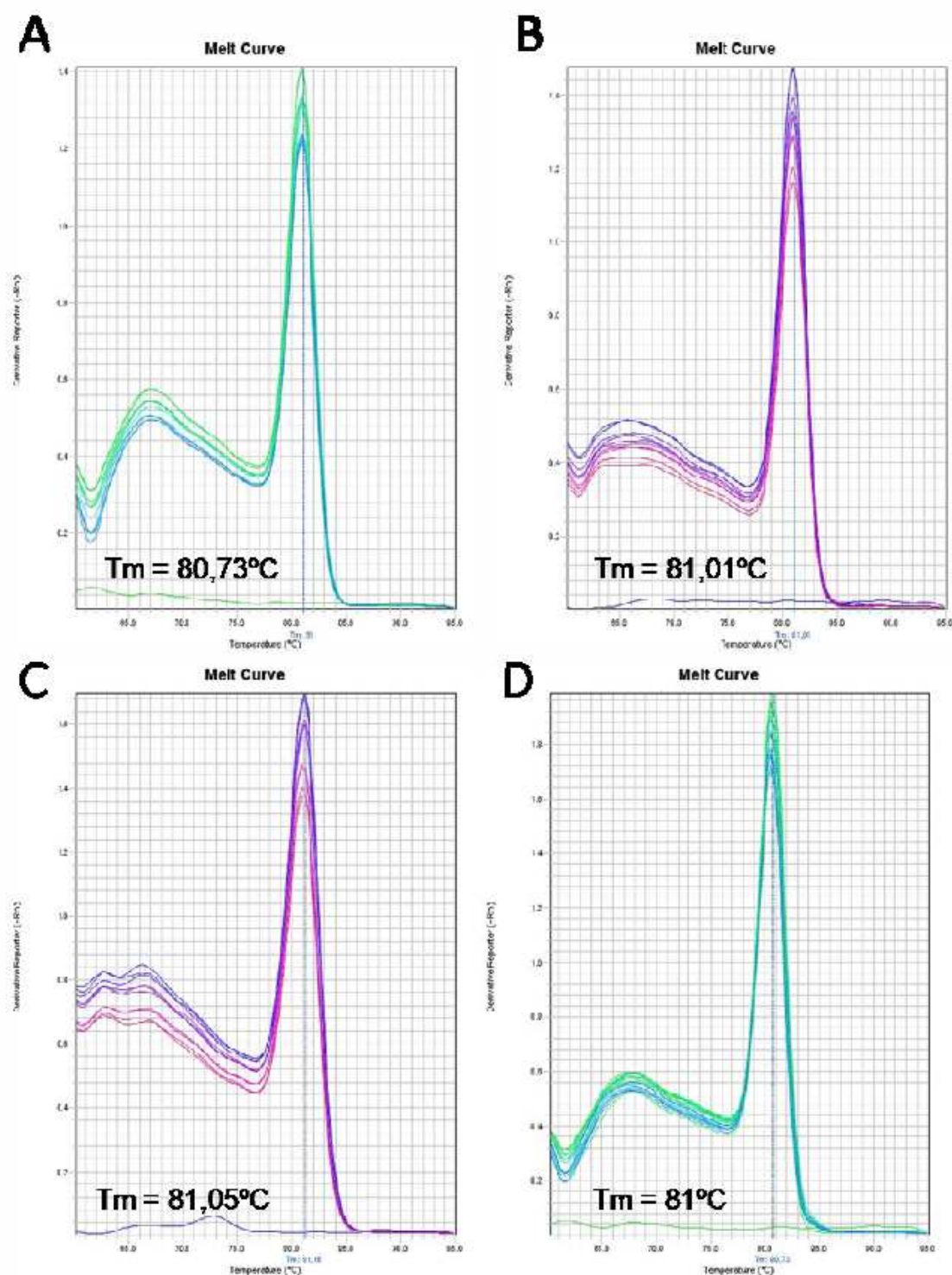


Figura 8.3: Curvas de “melting” representativas de resultados obtidos em equipamento de PCR em tempo real, após a realização de testes de amplificação do RNA_m para UBC (A), FoxP3 (B), IL-10 (C) e TGF-β (D). É possível observar que a reação utilizando os “primers” na concentração descrita acima é específica, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de “melting” (T_m) idênticas (em destaque em cada gráfico).

8.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (cópia digitalizada)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 30/11/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 584/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0462.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS NATURAIS (CD4+CD25+) NA IMUNOSSUPRESSÃO OBSERVADA EM PACIENTES COM PARACOCCIDIODOMICÓSE”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ronei Luciano Mamoni

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/10/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/10/07 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a possível participação das células T regulatórias naturais (CD4+ CD25+) na supressão da resposta imunológica observada em pacientes com paracoccidioimomocose (PCM), assim como avaliar possíveis mecanismos pelos quais essa supressão é realizada.

III - SUMÁRIO

Serão incluídos no estudo pacientes com a forma juvenil e adulta da PCM, atendidos no vários ambulatorios do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os indivíduos do grupo controle serão selecionados na zona endêmica de Campinas, principalmente no Bairro de Barão Geraldo (fazendas e hortas), próximos ao campus da UNICAMP. O grupo de pacientes será constituído de 15 indivíduos com as formas adultas ou juvenil da PCM selecionados antes do início do tratamento antifúngico e 15 indivíduos com PCM selecionados após a cura clínica e sorológica (antigenemia) e grupo controle contará com 15 indivíduos saudáveis com teste cutâneo negativo e antígenos do *P. brasiliensis*. Será coletada amostra de sangue periférico dos sujeitos e depois será avaliada a atividade da doença por meio da técnica de ELISA de inibição (antigenemia). Depois determinada a porcentagem e do fenótipo de células T naturais no sangue periférico por citometria de fluxo. Será feito a separação de células mononucleares do sangue periférico; avaliação da expressão gênica de Fox P3 pelas CMSP; separação magnética da população CD4+CD25+ (células T regulatórias naturais); marcação das células com CFSE; avaliação da atividade regulatória (inibição de proliferação); avaliação da produção de citocinas em culturas de células CD4CD25+ mantidas em sistema "transwell"; avaliação da produção de citocinas em culturas de células depletadas de linfócitos T CD4+CD25+; Análise estatística.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo é complexo e está estruturado. O TCLE está adequado. O orçamento está descrito, mas não revela a fonte dos recursos. O estudo não oferece riscos aos sujeitos, a não ser pelo desconforto de coletas sangue e a possibilidade de surgir hematoma e dor no local da punção. Não há menção se haverá aproveitamento total da amostra sanguínea ou o que será feita com a sobra, se houver.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de outubro de 2006.


Prof. Dr.ª Carmen Sylvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.3. Termo de consentimento pós-informação

Nome do Estudo: Avaliação da participação das células T regulatórias naturais (CD4⁺CD25⁺) na imunossupressão observada em pacientes com paracoccidiodomicose.

Pesquisador: Maria Carolina Ferreira

Local: Hospital das Clínicas - Unicamp

Nome do Paciente: _____

Idade: _____ RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Contatos:

Maria Carolina Ferreira – (19) 35218991

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni – (19) 35218991

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta – (19) 35219453

Objetivos do Estudo:

Nós pedimos a permissão de incluir o (a) senhor (a) como participante de um protocolo de pesquisa. O objetivo deste estudo é verificar a participação de um tipo de célula presente no sangue, denominadas células regulatórias naturais (CD4⁺CD25⁺) na infecção humana pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidiodomicose (blastomicose sul americana). Este estudo permitirá compreender melhor os mecanismos envolvidos nessa doença e dessa forma encontrar melhores formas de tratamento e intervenção.

Procedimentos:

Neste estudo colheremos uma amostra de sangue com a qual realizaremos todos os testes que necessitamos. Seu tratamento não será alterado em nada: não serão adicionados ou retirados medicamentos e todos os outros procedimentos ocorrerão sem nenhuma interferência. Informamos que o material coletado, será totalmente aproveitado (plasma e células sanguíneas) para a realização das diferentes metodologias descritas no projeto de pesquisa.

Riscos e Desconfortos

Nenhum risco maior ou desconforto ocorrerá devido ao estudo. A punção venosa ocorrerá como de costume e serão coletados 30mL de sangue. Como em qualquer coleta de sangue, durante o procedimento, poderá haver dor e/ou formação de hematoma no local da punção.

Recusa de Participação ou Retirada do Estudo

A participação neste estudo é voluntária. Você não tem nenhuma obrigação de participar deste estudo. Seu tratamento atual ou futuro não será afetado em caso de você não participar do estudo. Se você decidir participar, você poderá mudar de opinião e sair do estudo a qualquer momento sem que isto afete seu tratamento atual ou futuro neste hospital.

Recusa de Participação ou Retirada do Estudo

A participação neste estudo é voluntária. Você não tem nenhuma obrigação de participar deste estudo. Seu tratamento atual ou futuro não será afetado em caso de você não participar do estudo. Se você decidir participar, você poderá mudar de opinião e sair do estudo a qualquer momento sem que isto afete seu tratamento atual ou futuro neste hospital.

Confidencialidade

Informações médicas obtidas neste estudo farão parte do seu prontuário médico deste hospital. Informações que não fizerem parte do prontuário serão colocadas junto a arquivo dos investigadores e identificadas por códigos. O prontuário médico fica à disposição de médicos do complexo hospitalar do Hospital das Clínicas da Unicamp e quem tiver acesso a ele deverá manter a confidencialidade de acordo com as leis e política do hospital. Nenhuma informação será distribuída a pessoas fora do hospital sem seu consentimento prévio, a não ser em casos previstos neste termo de consentimento.

Informações do seu prontuário poderão eventualmente serem disponibilizados a órgãos governamentais no cumprimento de seu dever legal de zelar pela ética na pesquisa médica.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas ou livros médicos e serem usados para o ensino. Porém, seu nome e outros identificadores não serão usados em nenhum momento sem a sua devida permissão.

Requerimento de Maiores Informações

Você pode fazer novas perguntas sobre o estudo a qualquer momento. Os investigadores vão dar a você números de telefone e estarão disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas.

Se durante o estudo ou após você desejar discutir seus direitos como participante do grupo de estudo, tiver qualquer reclamação ou se sentir pressionado para participar do estudo ou para continuar nele, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp no telefone (19) 3521-8936.

Assinatura:

Eu confirmo que o objetivo do estudo, seus procedimentos e os possíveis riscos e desconfortos que eu possa experimentar foram explicados para mim. Alternativas a minha participação também foram discutidas. Todas as minhas questões foram respondidas. Li ou leri para mim este termo de consentimento. Minha assinatura abaixo indica minha inclusão no estudo.

Paciente

Data

Testemunha

Data

Eu atesto que expliquei o objetivo do estudo, seus procedimentos, identificando quais seriam investigativos, os possíveis riscos e desconfortos e respondi a todas as questões a respeito do estudo na melhor de minhas habilidades.

Representante do Estudo

Data